

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina de Lisboa



**TOXICOLOGIA LABORATORIAL NA ANÁLISE DO CONSUMO
DE NICOTINA POR MILITARES**

Vera Lúcia da Silva Louro

Orientador: Mestre Mário João Dias

Coorientador: Professor Doutor Jorge Costa Santos

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre em
Medicina Legal e Ciências Forenses

2016

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina de Lisboa



**TOXICOLOGIA LABORATORIAL NA ANÁLISE DO CONSUMO
DE NICOTINA POR MILITARES**

Vera Lúcia da Silva Louro

Orientador: Mestre Mário João Dias

Coorientador: Professor Doutor Jorge Costa Santos

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre em
Medicina Legal e Ciências Forenses

2016

Todas as afirmações efetuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos apresentados.

A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa em reunião de 20 de Setembro de 2016

“Matar o sonho é matarmo-nos. É mutilar a nossa alma. O sonho é o que temos de realmente nosso, de impenetravelmente e inexpugnavelmente nosso”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao Excelentíssimo Senhor Almirante CEMA, quero manifestar o meu profundo agradecimento por ter permitido efetuar este estudo no Laboratório de Análises Fármaco-Toxicológicas da Marinha.

Ao Senhor CMG-MN, Dr. Margalho Carrilho quero agradecer a confiança que depositou em mim para a realização deste estudo.

Ao Senhor CMG-FN, Dr. Humberto Tavares, Diretor do Laboratório de Análises Fármaco-Toxicológicas da Marinha, um especial agradecimento pela forma como me recebeu e como se disponibilizou para ajudar em todo o processo.

Ao meu Orientador, Mestre Mário João Dias, quero agradecer o apoio e disponibilidade que demonstrou, desde o primeiro dia, para me orientar, e acima de tudo, obrigada por acreditar em mim e neste projeto. Obrigada por não me deixar desistir quando tudo parecia correr menos bem.

Ao Professor Doutor Jorge Costa Santos, meu Coorientador, quero agradecer a disponibilidade que demonstrou para coorientar o meu projeto, pelo apoio demonstrado no momento da escolha do tema e do local para a realização deste estudo.

Ao Senhor 1TEN TSN-FAR, Nuno Flores, Gestor da Qualidade, que me acompanhou durante o tempo em que estive no Laboratório, um profundo agradecimento. Nunca terei palavras para descrever a sua disponibilidade, empenho e incentivo durante este percurso. Obrigada por todos os ensinamentos e apoio, e pela confiança que depositou em mim e neste estudo.

À Dr.^a Manuela Marques, um especial agradecimento pelo apoio bibliográfico.

Não poderia deixar de agradecer à restante equipa do LAFTM, Oficiais, Sargentos e Civis, que tão bem me receberam e sempre me acarinharam, como se fizesse parte da equipa.

À minha família, o meu pilar, que sempre me apoiou, que desde o início me deu força e me encorajou a seguir em frente quando tudo parecia correr menos bem. Obrigada pela paciência, por compreenderem as minhas ausências, por acreditarem nas minhas capacidades. Obrigada aos meus pais por me terem ensinado a ser forte e nunca desistir dos meus sonhos. Aos meus irmãos, Bruno e André, em especial ao Bruno que sempre me encorajou a dar o melhor de mim, todos os dias.

Aos meus amigos, família que eu escolhi, obrigada por estarem presentes, por acreditarem em mim, por todas as palavras de incentivo e por toda a ajuda! Não posso deixar de agradecer à Inês Lopes que sempre se mostrou disponível para me ajudar e aconselhar.

Um especial agradecimento àqueles que comigo percorreram esta caminhada, que comigo partilharam os medos, as dúvidas, sem vocês esta jornada teria sido, sem dúvida, mais difícil. Obrigada por todos os conselhos, por todas as confidências, por todos os sorrisos que partilhámos: Ana Filipa Resende, Andreia Pinto, Filipa Serrano, Pedro Mira e Sara Evaristo, levo-vos no coração.

RESUMO

Quando chegou à Europa, a “erva maravilhosa”, como era conhecida a planta de tabaco, foi divulgada como se se tratasse de uma planta com propriedades clínicas. Ao longo dos séculos, e apesar do consumo de tabaco se ter tornado um hábito enraizado na sociedade, surgiram opositores ao uso desta planta.

A nicotina, principal substância psicotrópica existente na planta de tabaco, pode ser encarada como uma das drogas mais viciantes entre as drogas que causam dependência, responsável pelo hábito do tabagismo, causa de morte e morbilidade evitáveis em todo o mundo.

Rapidamente absorvida pela pele, mucosas e pulmões, os seus efeitos podem ser detetados essencialmente ao nível do Sistema Nervoso Central, mas também a outros níveis, nomeadamente ao nível do Sistema Nervoso Autónomo ou do Sistema Enzimático Hepático.

Atualmente, os valores relativos ao consumo em Portugal são elevados, sendo que no último ano, menos de 1% dos consumidores conseguiu deixar de fumar. Estes valores estão longe de ser encarados com otimismo, pelo que ao longo dos últimos anos, verificaram-se várias alterações na legislação e foram criados planos de prevenção.

Cabe às entidades empregadoras prestar apoio aos funcionários no combate a qualquer tipo de dependência, por forma a melhorar o desempenho e competitividade dos mesmos. Também neste campo a Marinha Portuguesa presta assistência aos seus militares, com o objetivo de evitar o consumo de substâncias lícitas ou ilícitas cujo consumo possa interferir ao nível da

segurança dos militares, das instalações, assim como influenciar o exercício das suas funções.

A população de estudo, Mergulhadores e Guarnição de Submarino são militares sujeitos a condições fisiológicas e psicossociais muito particulares, e cujo consumo de nicotina, a médio ou longo prazo, pode trazer consequências nefastas.

A monitorização do consumo de tabaco constitui por isso um instrumento importante na prevenção do consumo. Para o efeito foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica de rastreio e confirmação que permite a deteção na urina da presença de cotinina, principal metabolito da nicotina.

Esse estudo teve por objetivo, por um lado, a validação do método de rastreio e, por outro, determinar a prevalência do consumo de nicotina entre Mergulhadores e Guarnição de Submarino.

Relativamente ao método de confirmação, os parâmetros de validação preenchem todos os requisitos estabelecidos pelo LAFTM, sendo por isso considerado apto para a finalidade pretendida. Quanto ao método de rastreio, deve ter-se em atenção que o valor de *cut-off* estabelecido pelo fabricante do teste (200 ng/ml) permite identificar fumadores ativos, sendo que os ocasionais poderão não ser detetados pelo teste uma vez que apresentam concentrações inferiores ao limiar de 200 ng/mL.

Os resultados obtidos revelaram uma prevalência do consumo entre Mergulhadores (37%) idêntica á da população de controlo (36%) e cerca de 3 vezes superior ao consumo por parte dos militares que constituem a Guarnição de Submarino (16%). Atendendo às exigências fisiológicas dos militares da Esquadilha de Submarinos, nomeadamente os Mergulhadores, a elevada

percentagem de fumadores ativos recomenda a implementação de programas para a cessação tabágica, no âmbito do Programa para a Prevenção e Combate à Droga e Alcoolismo nas Forças Armadas.

Palavras-chave: nicotina; cotinina; mergulho; tabagismo

ABSTRACT

When it came to Europe, the “wonderful” herb, as it was known the tobacco plant, was disclosed as if it were a plant with clinical properties. Over the centuries, in spite of smoking has become a habit rooted in society, opponents to the use of this plant were emerging.

Nicotine, the main psychoactive substance existing in the tobacco plant, can be seen as one of the most addictive drugs among addictive drugs, responsible for the smoking habit, cause of death and worldwide mortality. Quickly absorbed by the skin, mucous membranes and lungs, its effects can be detected mainly at the level of the central nervous system, but also to other levels, particularly at the level of the autonomic nervous system or liver enzyme system.

Currently, consumption relative values in Portugal are quite high, and in the last year, less than 1% of consumers could quit. These figures are far from being met with optimism, so over the last few years, there have been several legislative changes and prevention plans were created.

It is up to employers to support employees in fight against any kind of addiction, in order to improve their performance and competitiveness. The Portuguese Navy assists their military in this field as well, mainly to avoid the consumption of licit or illicit substances whose consumption can interfere with the individual security, as well as influencing the performance of their duties.

The study population, Divers and Submarine Trim belonging to the Squadron of Submarines, are subjected either to physiological as psychosocial special conditions, and whose nicotine consumption can bring disastrous consequences in a medium or long-term.

The tobacco consumption monitoring is therefore an important tool in the consumption prevention. In this context an analytical methodology for screening and confirmation, that allows detection in urine presence of cotinine, nicotine metabolite that proves the use of tobacco, was developed.

This study has two purposes: 1) the validation of a screening method, and 2) the determination of the prevalence of nicotine consumption by military.

Regarding the confirmatory method validation parameters meet all the requirements set by LAFTM and is therefore deemed fit for the intended purpose. As for the screening method, it should be borne in mind that the value of cut-off established by testing the manufacturer (200 ng/ml) allows to identify active smoking, and the occasional ones cannot be detected by the test since they have concentration less than 200 ng/ml.

The results showed a prevalence of consumption among divers (37%) identical to the control population (36%) and about three times higher than consumption by the military that make up the trim submarine (16%). Given the physiological demands of the military of Submarine Squadron including divers, the high percentage of smokers recommends the implementation of smoking cessation programs, under the Program to Prevent and Combat Drug and Alcohol Abuse Among the Military.

Keywords: nicotine; cotinine; diving; smoking

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS	xvii
SIGLAS, ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xix
CAPÍTULO I - Introdução	1
1. Consumo de nicotina	1
1.1. História da Nicotina	2
1.2. Nicotina – Farmacocinética e Farmacodinâmica	5
1.2.1. Mecanismos de ação	7
1.2.2. Farmacodinâmica e Toxicidade	8
1.2.3. Farmacocinética	9
2. Legislação	13
3. Marinha Portuguesa	17
3.1. Mergulhadores	20
3.1.1. Efeitos fisiológicos do mergulho nos sistemas Cardiovascular e Respiratório	22
3.1.2. Impacto do consumo de nicotina no mergulho	29
3.2. Guarnição de Submarinos	33
4. Métodos analíticos de deteção, identificação e confirmação	36
4.1. Métodos de preparação de amostras	38

2.4 Solução de extração	60
2.5 Amostras controlo de Gama Baixa e Gama Alta	60
2.6 Amostra Negativa	61
2.7 Branco de reagentes	61
2.8 Calibradores	61
3. Materiais e equipamentos	62
4. Amostras biológicas	62
5. Metodologia analítica	64
5.1. Condições cromatográficas	64
5.2. Processo de extração líquido-líquido	66
5.2.1. Procedimento de extração	66
6. Procedimentos de validação do método de confirmação	67
6.1. Especificidade / Seletividade	67
6.2. Capacidade de identificação	68
6.3. Limite de deteção e Limite de quantificação	68
6.4. Repetibilidade	68
6.5. Arrastamento	69
6.6. Linearidade	69
6.7. Precisão / Exatidão	69
6.8. Recuperação	70
6.9. Robustez	70
7. Análise de amostras da população de estudo	71
8. Validação do método de rastreio (imunoensaio)	71
CAPÍTULO IV – Resultados e Discussão	73
1. Validação do método de confirmação	73

1.1. Especificidade / Seletividade	73
1.2. Capacidade de identificação	75
1.3. Limite de detecção e Limite de quantificação	77
1.4. Repetibilidade	79
1.5. Arrastamento	80
1.6. Linearidade	81
1.7. Precisão / Exatidão	82
1.8. Recuperação	87
1.9. Robustez	87
2. Validação do método de rastreio	88
3. Prevalência do consumo de nicotina na população de estudo	91
3.1 Questionários	91
3.2 Amostras de urina	95
CAPÍTULO V – Conclusão	99
1. Perspetivas futuras	101
Referências Bibliográficas	103
Anexos	
I - Método Analítico	
II - Questionário	
III - Tabelas de resultados dos questionários	

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Concentração de cotinina quantificada em diferentes matrizes biológicas	38
Tabela 2: Características da extração líquido-líquido na preparação de amostras com cotinina.	40
Tabela 3: Parâmetros de validação do método	46
Tabela 4: Valores de tolerância máxima para as abundâncias relativas dos iões	48
Tabela 5: Tabela ANOVA “two factor fully-nested design”	53
Tabela 6: Cálculo das estimativas de precisão.	54
Tabela 7: Preparação de amostras controlo, amostra negativa e branco de reagentes	61
Tabela 8: Resultados obtidos para o parâmetro de Especificidade/Seletividade	75
Tabela 9: Resultados do parâmetro Capacidade de Identificação	76
Tabela 10: Resultados obtidos para o estudo do LQ e LD	77
Tabela 11: Resultados obtidos para o estudo do LQ e LD Estatística de regressão	78
Tabela 12: Resultados obtidos para o estudo do LQ e LQ ANOVA	78
Tabela 13: Resultados obtidos para o estudo do LQ e LQ estudo estatístico	78
Tabela 14: Resultados obtidos para o estudo do LQ e LQ	78

resultado residual	
Tabela 15: Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade	80
Tabela 16: Resultados obtidos para o estudo da Linearidade	81
Tabela 17: Resultados obtidos para o estudo da linearidade	82
estatística de regressão	
Tabela 18: Resultados obtidos para o estudo da linearidade	82
ANOVA	
Tabela 19: Resultados obtidos para o estudo da linearidade	82
estudo estatístico	
Tabela 20: Resultados obtidos para o estudo da linearidade	82
resultado residual	
Tabela 21: Resultados para o estudo da precisão intermédia	83
(200 ng/ml)	
Tabela 22: Resultados para o estudo da precisão intermédia	84
(400 ng/ml)	
Tabela 23: Valores obtidos no estudo da precisão intermédia	84
200 ng/ml	
Tabela 24: Valores obtidos no estudo da precisão intermédia	85
400 ng/ml	
Tabela 25: Resultados obtidos no estudo da exatidão	86
Tabela 26: Resultados da recuperação média	87
Tabela 27: Resultados da análise de rastreio e confirmação	89
por GC-MS	
Tabela 28: Resultados da sensibilidade e especificidade dos	90
testes de rastreio	

Tabela 29: Dados da População de Guarnição de Submarino	114
Tabela 30: Dados da População de Mergulhadores	115

ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS

	Página
FIGURAS	
Figura 1: Curva de dissociação do Oxigénio	31
Figura 2: Diagrama do sistema GC-MS	44
Figura 3: Condições do injetor	65
Figura 4: Condições cromatográficas	65
Figura 5: Cromatograma de uma amostra positiva	74
Figura 6: Cromatograma de uma amostra negativa	74
GRÁFICOS	
Gráfico 1: Curva de calibração para o estudo do LQ e LD	77
Gráfico 2: Curva de calibração para o estudo da linearidade	81
Gráfico 3: Distribuição dos militares por especialidade	91
Gráfico 4: Distribuição da população por faixa etária	92
Gráfico 5: Tipo de consumo	93
Gráfico 6: Idade de início de consumo por parte da população de estudo	94
Gráfico 7: Média de consumo diário por parte da população de estudo	95
Gráfico 8: Resultados dos testes de rastreio	96
Gráfico 9: Resultado da quantificação das amostras	97
Gráfico 10: Resultados do consumo para a população de controlo	98

SIGLAS, ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

Amostra Branca	Amostra de urina isenta da substância a analisar
ANOVA	Análise de variância
Branco de reagentes	Aplicação do método analítico completo, omitindo a toma de amostra ou substituindo-a por uma porção de um solvente adequado
CE	Comissão Europeia
CV	Coeficiente de variação
Cut-off	Concentração de corte utilizada para determinar a positividade/negatividade de uma amostra
DGS	Direção Geral de Saúde
Gama de trabalho	É o intervalo entre concentrações as concentrações máxima e mínima de um analito (incluindo estas) numa amostra., para a qual tenha sido demonstrado que o procedimento analítico apresenta níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade.
GC/MS	Cromatografia Gasosa / espectrometria de massa
IDT/SICAD	Instituto da Droga e Toxicodependência / Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências
LAFTM	Laboratório de Análises Fármaco-Toxicológicas da Marinha

Limite de Detecção	A quantidade mais pequena de um analito presente numa amostra que pode ser detetada mas não necessariamente quantificada com um valor exato
Limite de Quantificação	A quantidade mais pequena de um analito presente numa amostra que pode ser determinada quantitativamente dentro de uma precisão e exatidão aceitáveis.
m/z	Relação massa carga
NRP	Navio da República Portuguesa
OIT	Organização Internacional de Trabalho
P.I.	Padrão Interno
UTITA	Unidade de Tratamento Intensivo de Toxicodependências e Alcoolismo
WHO	World Health Organization

CAPÍTULO I - Introdução

1. Consumo de Nicotina

O consumo de substâncias ilícitas e o abuso de álcool é um problema que afeta toda a sociedade com consequências quer para a saúde do indivíduo que as consome, quer para o meio social e profissional em que se insere. Porém, existem substâncias psicoativas lícitas, nomeadamente a nicotina, que pelo seu consumo ocasional ou continuado, podem interferir não apenas na saúde do consumidor, mas também em ambiente laboral, principalmente quando o consumidor está sujeito a condições de trabalho particulares, e onde o consumo pode, a médio ou longo prazo, interferir no seu desempenho.

Atualmente o consumo de tabaco é responsável pela principal causa de morte e de doença evitável nos países desenvolvidos, e a sexta causa a nível mundial, o que leva, inevitavelmente, a um aumento dos custos na área da saúde (1).

De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde, o tabagismo foi responsável pela morte de 100 milhões de pessoas durante o século passado, sendo que atualmente, o consumo de tabaco mata em todo o mundo mais do que o VIH/SIDA, Tuberculose e Malária, juntos (1). Anualmente perdem a vida cerca de 6 milhões de pessoas a nível mundial e 700 000 pessoas na União Europeia, das quais 19 000 por exposição ao fumo ambiental(1-2).

Em Portugal, segundo as estimativas relativas ao ano de 2010, o tabaco foi responsável pela morte de 11 800 pessoas, sendo que a exposição ao fumo ambiental foi responsável pela morte de 845 pessoas (3). Estudos realizados em ambiente escolar demonstraram que o início do consumo de substâncias

psicotrópicas, álcool e tabaco se inicia entre os 13 e os 16 anos. O Inquérito Nacional em meio escolar realizado pelo SICAD, em 2011, a alunos do ensino secundário mostrou que o consumo de tabaco aumentou de forma generalizada desde 2006. Dos 27000 alunos inquiridos, 49% declarou ser consumidor de tabaco. Importa referir que se verificou um aumento da prevalência essencialmente nos locais que em 2006 mostravam consumo mais reduzido (4). Apesar da elevada prevalência e do início precoce, estes valores não são muito diferentes dos valores apresentados pelo estudo “Eurobarómetro”, que revela que mais de 90% dos fumadores portugueses iniciaram o consumo antes dos 25 anos, sendo a média de consumo de 17,7 anos, valor semelhante à média europeia (2). Já em 2012, mais de um quarto da população com idades entre os 15 e os 64 anos consome tabaco, dos quais 86% declararam pouca motivação para cessar o consumo (5)

1.1. História da Nicotina

Não é possível datar com precisão o início do consumo de nicotina, sabe-se que o consumo se iniciou no Continente Americano, onde os indígenas fumavam tabaco durante as cerimónias religiosas. Por todo o continente, várias culturas indígenas usavam o tabaco para entrar em transe, numa espécie de ritual sagrado.

Só no século XVI a nicotina chegou à Europa pela mão de Cristóvão Colombo. Foram os marinheiros que Colombo enviou para terra que observaram o “ritual”, e fascinados decidiram experimentar. Feita a experiência, os navios regressaram à Europa carregados com aquela erva “maravilhosa”. A planta de

tabaco foi trazida para Portugal por um jesuíta, o Padre Luis de Góis. Em território francês, a planta de tabaco foi divulgada por André Thévet, um franciscano que havia regressado do Brasil, no entanto foi Jean Nicot, embaixador em Portugal, quem se fez ouvir quando recomendou a utilização de nicotina à rainha Catarina de Médicis, para melhorar as suas enxaquecas. Por essa razão, durante esse período, a nicotina teve várias designações, tais como “erva da rainha”, “erva mediceia” ou “catarinária” (6-8).

No nosso país o consumo de tabaco foi incentivado por várias personalidades ligadas à igreja: em 1550 o Padre Manuel da Nóbrega elogiava as qualidades clínicas da planta de tabaco, o Padre Leonel de Sousa, num manuscrito, enumerava as aplicações benéficas do consumo e o Padre Rafael Bluteau proclamava a “inocência do tabaco” no seu “Vocabulário Portuguez” (9).

Cinquenta anos após a sua chegada à Europa, o consumo de tabaco tornou-se um hábito socialmente aceite, já que se fumava cachimbo por quase todo o continente. Entre os indivíduos mais abastados da sociedade foram criadas tertúlias, onde homens, e também algumas mulheres, fumavam cachimbo, nas chamadas “Tabagies”. Um hábito que passou a ser prática corrente em reuniões de ministros, generais e políticos enquanto tomavam importantes decisões sobre o país.

Em 1737, e após cerca de dois séculos de discussão sobre a autoria da introdução do tabagismo, atribuída por uns a Jean Nicot, do qual deriva o termo “nicotina”, e por outros a André Thévet, Lineu classificou a nicotina como *Nicotiana tabacum*, assim como as restantes variedades *Nicotiana rustica*, *Nicotiana glutinosa* e *Nicotiana penicilata*.

Existem mais variedades identificadas, essencialmente no Perú, mas as mais comuns são a *Nicotiana tabacum*, suave e de aroma mais delicado, e a *Nicotiana rustica*, ao contrário, apresenta um sabor desagradável e é mais forte.

Apesar das variedades de nicotina conhecidas, só em 1809 foi identificado um composto básico azotado no extrato do tabaco por Vauquelin. Posteriormente, em 1828, Posselt e Reimann, conseguiram isolar o composto identificado por Vauquelin, ao qual chamaram “nikotin”. A fórmula química da nicotina foi determinada em 1840, e a substância sintetizada pela primeira vez em 1890 (6).

Desde o início da exportação de nicotina para a Europa que os governantes dos diferentes países perceberam que estava ali uma fonte de rendimento para os cofres públicos e que a sua exploração seria bastante rentável, até porque o consumo de nicotina deixou de ser exclusivo das classes mais ricas, para começar a ser consumido pelos mais pobres. O cachimbo e os charutos eram de alguma forma a imagem de uma classe mais abastada, no entanto nas ruas o povo usava o rapé, que era colocado numa depressão da região dorsal da mão, junto ao polegar (a chamada tabaqueira anatómica) e aspirado.

Em meados do século XIX surge o cigarro, apesar de já se fumar tabaco enrolado em papel, só agora começava a ter maior visibilidade e, consequentemente, maior procura. Por ser mais barato e fácil de transportar, durante a Primeira Guerra Mundial, a sua expansão foi notável. Apesar do consumo até então ser quase exclusivo dos homens, após a Segunda Guerra Mundial, o consumo por parte do sexo feminino viria a vulgarizar-se.

1.2. Nicotina - Farmacocinética e Farmacodinâmica

A nicotina, principal substância psicotrópica existente nas folhas de tabaco, atua como um potente estimulante, quer em humanos, quer em animais, sendo a responsável pela adição resultante do consumo de cigarros e de outros produtos do tabaco em cuja composição está presente (10). Cada cigarro contém entre 6 a 11 mg de nicotina, no entanto existem outras substâncias tóxicas, resultantes da combustão do tabaco, como o alcatrão ou o monóxido de carbono, que contribuem para o desenvolvimento de patologias como cancro do pulmão, cancro da boca e esófago, doença periodontal, que pode levar à perda de dentes e osso, entre outras (11). Em concentrações mínimas, resultante do uso de inseticidas cuja composição contém nicotina, pode ser detetada em alguns vegetais da família das solanáceas, usados regularmente na alimentação, nomeadamente na batata, na beringela, na couve-flor, no chá verde ou na polpa de tomate (6, 12).

A nicotina é um alcaloide natural, derivado do ácido nicotínico, incolor, volátil e básico, com um valor de $pK_a=8,5$, composto por anéis de piridina e pirrolidina. A sua síntese dá-se ao nível das raízes, subindo para o caule e para as folhas, sendo que as maiores concentrações desta amina terciária se encontram nas folhas mais altas e na zona proximal do caule. A nível estrutural, a molécula de nicotina contém um carbono assimétrico, como tal existem dois estereoisómeros que podem variar de acordo com o tipo de planta de tabaco, l-nicotina e d-nicotina, sendo que o primeiro, do ponto de vista farmacológico, é 100 vezes mais ativo.

Do ponto de vista qualitativo e quantitativo, os mais importantes metabolitos da nicotina são a cotinina e o óxido-N-nicotina. Estes metabolitos podem ser detetados em diferentes matrizes biológicas, como a urina, o sangue, a saliva, o cabelo, ou em outras matrizes alternativas como unhas, sangue do cordão umbilical ou dentes decíduos (13).

A cotinina é usada como marcador de consumo de tabaco, uma vez que este metabolito pode ser detetado na urina até 60 horas após o consumo. O seu tempo de semi-vida é superior ao da nicotina, razão pela qual este metabolito se torna preferencial na identificação de fumadores. A nicotina tem um tempo de semi-vida de 2 horas, enquanto a cotinina apresenta um tempo de semi-vida de 20 horas. Apesar de não existir um *cut-off* estabelecido para a cotinina na urina, alguns autores mostraram que através dos valores quantificados em urina é possível fazer uma distinção entre fumadores ativos e fumadores passivos e/ou ocasionais. Tuomi e col. (citado por Malafatti et al., 2009) revelaram valores de cotinina acima de 100 ng/ml estariam associados a fumadores ativos, enquanto de acordo com o estudo realizado por Jarvis e col. (citado por Malafatti et al., 2009) valores na ordem dos 22,5 ng/ml estariam associados a fumadores passivos. No entanto outros autores defendem que valores abaixo dos 20 ng/ml estão associados a não fumadores, fumadores passivos apresentam valores entre os 20 e os 100 ng/ml, fumadores ativos aparecem descritos com valores entre os 100 e os 500 ng/ml, já em fumadores cujo consumo é elevado os valores ultrapassam os 500 ng/ml (13).

Apesar da via inalatória ser a mais comum, existem outras formas de administração de nicotina. Nos fumadores ativos a inalação acontece durante o

consumo de cigarros ou cigarrilhas, enquanto nos fumadores passivos se verifica pela inalação de fumo ambiental. A administração por via intranasal está associada ao uso de *sprays* que contém nicotina na sua composição; por via oral, através do consumo de charutos ou de pastilhas mastigáveis e ainda por via transdérmica devido ao uso de adesivos que libertam, de forma contínua, nicotina.

1.2.1. Mecanismos de ação

A dependência de uma determinada droga está associada a mecanismos fisiológicos, que provocam a libertação de dopamina, um neurotransmissor que provoca uma sensação de prazer após o consumo. Esta sensação de prazer associada ao consumo leva a um reforço positivo, aumentando a frequência do consumo. No entanto, este consumo repetido provoca tolerância, isto é, dá-se uma diminuição do efeito da droga, o que leva à diminuição do intervalo de tempo entre doses, e, conseqüentemente, a um aumento no consumo.

A nicotina, na sua forma ativa, é um catião, em que a carga se encontra localizada no ciclo de piridina. Pelo facto desta forma ativa ser semelhante à da acetilcolina, a nicotina torna-se um agonista direto dos recetores nicotínicos da acetilcolina, nAChR, maior neurotransmissor do cérebro.

A acetilcolina pode ligar-se a dois tipos de recetores: os recetores de nicotina e os recetores de muscarina, ambos ativados pelos recetores colinérgicos.

Quando atinge o cérebro, a nicotina atua nos subtipos $\alpha 4$, $\alpha 2$ e $\alpha 7$ dos nAChR no córtex e no hipocampo, o que provoca a abertura dos canais iónicos. A abertura destes canais, levam à passagem de iões de sódio para o meio

intracelular, ocorrendo a despolarização da membrana celular, que leva ao início de um potencial de ação. Posteriormente o canal fecha e o recetor fica temporariamente refratário aos agonistas. Após este processo, o recetor readquire a sua conformação inicial, tornando-se sensível aos agonistas (14).

Ao nível da medula, e devido à estimulação de células inibitórias de Renshaw, verifica-se um relaxamento do músculo esquelético (15).

A ação da nicotina leva à inibição da ativação de recetores de serotonina, ou recetores 5-HT₃. Estes recetores são canais iónicos, existentes na área postrema e em terminais nervosos sensitivos. A estimulação destes recetores provoca a abertura dos canais e a passagem de catiões que excitam os neurónios.

Ao nível da área tegmental ventral, a nicotina provoca a estimulação dos nAChR, o que leva à libertação de neurotransmissores que aumentam os níveis de dopamina no *nucleus accumbens*. Existe ainda libertação de outros neurotransmissores que medeiam vários efeitos da nicotina, nomeadamente a norepinefrina, o ácido gama-aminobutírico (GABA), o glutamato, a acetilcolina, a serotonina e a endorfina (15-16).

1.2.2. Farmacodinâmica e Toxicidade

Os efeitos provocados pelo consumo de nicotina podem variar de acordo com a dose administrada, a via de administração, o metabolismo do consumidor, entre outros fatores. Os efeitos adversos ocorrem, essencialmente ao nível do Sistema Nervoso Central, mas também a outros níveis.

Ao nível do **Sistema Nervoso Central** verifica-se uma ativação da *via de recompensa*, responsável pela sensação de prazer. A administração/consumo de pequenas doses de nicotina provocam uma ligeira analgesia e aumento do ritmo respiratório. Por outro lado, a administração/consumo de elevadas doses de nicotina podem provocar convulsões, tremores, assim como depressão respiratória. Podem verificar-se outras alterações como o aumento do estado de vigília, da *performance* cerebral ou um aumento, ainda que temporário, da capacidade de memorização. O consumo de nicotina tem implicações na regulação do humor, no entanto diminui a tensão e a ansiedade.

A nicotina tem efeitos ao nível do **Sistema Nervoso Simpático** e **Parassimpático**. A atuação ao nível do SNS provoca fenómenos de vasoconstrição, hipertensão e ou taquicardia. Quando atua no SNP verifica-se um aumento da motilidade intestinal, aumento da salivação, assim como das secreções pulmonares.

Há ainda alterações ao nível dos **Neurónios motores** e do **Sistema enzimático hepático**. No primeiro, o consumo provoca contração muscular, no segundo verifica-se um aumento da velocidade e metabolização de fármacos e substâncias endógenas (6, 17).

1.2.3. Farmacocinética

A nicotina pode ser encontrada na forma ionizada ou na forma não ionizada, dependendo da fase em que é encontrada: na fase gasosa ou na fase particulada. Na forma não ionizada, a nicotina é absorvida rapidamente já que

se encontra associada à fase gasosa. Nesta fase a nicotina é mais ativa, o que leva a um aumento da dependência.

No entanto, a **absorção** de nicotina depende do pH das membranas celulares. Na sua forma ionizada, a quantidade de nicotina que atravessa as membranas celulares é menor. Importa referir que o pH do fumo do produto de tabaco consumido também interfere na absorção.

O fumo das cigarrilhas, do cachimbo e dos charutos é alcalino, como tal a absorção de nicotina é extensa ao nível da mucosa oral, mesmo que não haja inalação profunda, a concentração de nicotina absorvida é elevada. Por outro lado, o fumo dos cigarros comerciais é mais ácido, conseqüentemente a absorção de nicotina é reduzida ao nível oral, verificando-se uma elevada absorção ao nível dos alvéolos pulmonares, onde a superfície de contacto é elevada (18). Assim, quanto mais ácido é o fumo resultante do produto consumido, mais ionizada se encontra a nicotina, razão pela qual terá mais dificuldade em atravessar as membranas celulares (6).

A nicotina absorvida, após uma inalação profunda, ao nível dos alvéolos pulmonares, mistura-se com fluidos biológicos de pH alcalino (7,4), o que facilita a passagem da nicotina para os capilares sanguíneos, e leva a uma **distribuição** total no fluxo sanguíneo. Quando o consumo de nicotina ocorre por via oral, a absorção de nicotina dá-se ao nível do intestino delgado, isto porque o pH da mucosa gástrica é demasiado ácido, o que impede a absorção (19).

Após a absorção, a nicotina entra na circulação sanguínea encontrando-se cerca de 69% na forma ionizada e 31% na forma não ionizada. A nicotina é

extensamente distribuída pelos tecidos com um volume de distribuição médio de peso corporal de 2.6 l/kg. Ao nível da distribuição, verifica-se uma maior afinidade da nicotina para o fígado, os rins, o baço e os pulmões, por oposição ao tecido adiposo, cuja afinidade é menor. O tempo que a nicotina demora a chegar ao cérebro ou a outro órgão, e o respetivo efeito farmacológico depende da quantidade de nicotina consumida e da via de administração. (19)

A nicotina é **metabolizada** essencialmente no fígado por ação do citocromo P450 2A6 (CYP2A6), sendo o produto principal desta biotransformação a cotinina, apesar de eliminar uma pequena quantidade de nicotina sofrer biotransformação ao nível dos pulmões. A nicotina sofre reação de fase I, oxidação na posição 5 do anel pirrolidinico, sendo 70% da nicotina oxidada a cotinina, 17% transforma-se em nornicotina, 4% é oxidada dando origem a outros metabolitos e 9% é excretada inalterada. Devido ao efeito de primeira passagem, a biodisponibilidade ronda os 30% (11, 6).

Apesar da grande percentagem de nicotina que é metabolizada, existem fatores que podem influenciar o processo. Fatores genéticos, idade, fatores fisiológicos associados ao tipo de dieta realizada pelo consumidor, diferenças raciais, género, consumo de medicamentos, até o próprio consumo de tabaco.

O metabolismo de nicotina é influenciado pelo gene CYP2A6. Este gene possui o seu *locus* no cromossoma 19 e possui um elevado polimorfismo. Basta uma deleção num dos 20 alelos mais estudados para que a metabolização de nicotina seja reduzida. Em indivíduos que não possuem qualquer deleção em nenhum dos alelos e são homozigóticos, a metabolização de nicotina ronda os 80%.

De acordo com Nakajima e col. (2000), 51% da população de Caucasianos, de Coreanos e de Japoneses possuem polimorfismo do gene CYP2A6, o que limita a biotransformação de nicotina em cotinina. Nestes casos a análise de nicotina, e não do metabolito cotinina, deve ser opção para comprovar o consumo, no entanto o curto tempo de semi-vida desta substância representa uma limitação (11).

O metabolismo é afetado pela idade, na medida em que se verifica um decréscimo na *clearance* de nicotina em indivíduos com idade superior a 65 anos, quando comparados com jovens adultos. Também se verifica uma diminuição do volume de distribuição em indivíduos mais velhos, devido à perda de massa corporal. A questão do peso corporal também provoca alterações na *clearance*. Nas mulheres a *clearance* total é inferior à dos homens. Verifica-se também uma diminuição do tempo de semi-vida da cotinina nas mulheres.

Pelo facto de a nicotina ser um estimulante, o próprio consumo de tabaco provoca alterações no metabolismo. A *clearance* em fumadores é menor quando comparada com não fumadores (19).

A **eliminação** é essencialmente renal, por filtração glomerular e secreção tubular, razão pela qual a urina se torna a matriz biológica de eleição para a quantificação desta substância. No entanto também pode ser eliminada através das fezes e do suor.

Tal como referido anteriormente, cerca de 80% a 90% da nicotina que é absorvida é eliminada na urina, no entanto a quantidade eliminada depende de alguns fatores fisiológicos, nomeadamente da função renal de cada indivíduo,

do fluxo urinário e do pH da urina. Em urina o valor médio para a *clearance* renal ronda os 35 a 90 ml/min. Numa urina ácida a reabsorção tubular é reduzida o que leva a um aumento da *clearance* renal para valores na ordem dos 600ml/min. Por oposição, em urinas alcalinas, a reabsorção é mais elevada, consequentemente a *clearance* renal sofre uma redução para cerca de 17ml/min. De salientar que se existirem patologias associadas, estes valores sofrem alterações que provocam uma redução da *clearance* renal.

Como mencionado anteriormente, uma pequena quantidade de nicotina e cotinina são eliminadas através do suor, no entanto, no caso particular desta matriz biológica, os níveis de nicotina eliminada são superiores aos de cotinina. De salientar que não existem estudos que permitam estabelecer uma relação da eliminação entre as duas matrizes biológicas mencionadas (19)

2. Legislação

Quando chegou a Portugal, o tabaco teve uma elevada aceitação, principalmente por parte da Igreja, no entanto ao longo dos séculos foram surgindo opositores ao uso desta planta, não só no nosso país, como em toda a Europa. A título de exemplo, em 1600 surgiu um decreto real em França que proibia o consumo de tabaco, mas sem sucesso. Posteriormente, em 1635, uma ordem da polícia de Paris proibia, “sob pena de prisão e chicote”, que o tabaco fosse comercializado por vendedores de bebidas. (9)

Apesar de todas as tentativas para controlar ou proibir o consumo que foram surgindo ao longo dos séculos, o consumo de nicotina tornou-se um hábito socialmente aceite e os valores relativos ao consumo são elevados. Por essa

razão houve a necessidade de restringir, e cada vez mais, o seu consumo através de legislação, de planos de prevenção e ações de sensibilização.

Para fazer frente a esta problemática, em 1999 foi lançado pela Organização Mundial de Saúde a preparação de uma Convenção-Quadro com o objetivo de controlar o consumo de tabaco, que viria a ser adotada na 56ª Assembleia Mundial da Saúde. Esta Convenção-Quadro contém as bases para a prevenção e controlo do tabagismo, e atualmente encontra-se ratificada pela quase totalidade dos estados membros da OMS (20). Em 2012, e por Despacho do Secretário de Estado Adjunto da Saúde, foi criado o Programa Nacional para a Prevenção e Controlo do Tabagismo. Este Plano visa aumentar a expectativa de vida saudável da população portuguesa, reduzindo a prevalência do consumo de tabaco, em consumidores habituais e ocasionais, com o objetivo de reduzir em 2% o consumo até 2016.(20)

Apesar de já em 1959 ter sido proibido o consumo de tabaco em recintos fechados, através do Decreto-Lei nº42 661, de 20 de Novembro, importa referir que a Lei nº 22/82, de 17 de Agosto, foi, de certa forma, o grande impulso para o início de uma política de prevenção do tabagismo em Portugal mais eficiente, já que definia as bases da prevenção do consumo (21). Posteriormente, em 2007, surge a Lei nº37/2007, de 14 de Agosto, que veio dar execução ao estabelecido pela Convenção, que “Aprova normas para a proteção dos cidadãos da exposição involuntária ao fumo do tabaco e medidas de redução da procura relacionadas com a dependência e a cessação do seu consumo” (22, 20).

De acordo com o disposto no Art.4º, é proibido fumar em todos os recintos fechados onde sejam prestados cuidados de saúde, nos locais onde estejam instalados Órgãos de Soberania e organismos da Administração Pública, em lares e locais destinados a menores de 18 anos, como escolas, infantários, museus, em superfícies comerciais, entre outros. No entanto há exceções, como refere o Art. 5º. É permitido fumar em áreas exclusivas de hospitais e clínicas psiquiátricas, centros de tratamento e reabilitação e unidades de tratamentos de toxicodependentes e alcoólicos destinadas a doentes fumadores, assim como em estabelecimentos prisionais. Existem outras exceções, nomeadamente restaurantes, bares, e outros locais desde que existam zonas diferenciadas para fumadores e não fumadores, devidamente sinalizadas, bem ventiladas, que garantam a proteção dos não fumadores. Além de todas estas medidas, também os fabricantes ou importadores de produtos de tabaco são obrigados a disponibilizar informações relativas à composição dos cigarros, assim como as respetivas quantidades utilizadas em cada cigarro. Os rótulos de cada maço de tabaco devem, obrigatoriamente trazer impressas as advertências ligadas ao consumo.

Relativamente à venda de produtos de tabaco, esta é proibida a menores de 18 anos. Apesar de ser proibido qualquer tipo de publicidade ou promoção, o tabaco é das substâncias mais consumidas em Portugal (22).

O consumo de tabaco continua a ser a primeira causa, evitável, de morbilidade e mortalidade em Portugal. De acordo com o relatório apresentado em Março do presente ano, os valores relativos ao consumo de tabaco em Portugal, no ano transato mostram que o número de consumidores diminuiu menos de 1%,

valor que fica abaixo do esperado (23). Todas as medidas restritivas acabam por se “diluir” com o passar do tempo, razão por que, em janeiro do presente ano, entrou em vigor uma nova legislação, isto é, uma alteração à Lei do Tabaco, Lei nº 37/2007, de 14 de agosto. Esta legislação propõe alterações às advertências que devem constar nas embalagens, que deixam de ser apenas escritas para passarem a mostrar imagens “chocantes” dos efeitos adversos do consumo de tabaco. Durante um ano, as tabaqueiras devem “escoar” para o mercado as embalagens antigas, com vista a esgotar os *stocks* existentes, já que a partir de maio, começaram a ser comercializadas as novas embalagens, sendo que durante o próximo ano os consumidores terão acesso a ambas as embalagens. Verificam-se também alterações relativas ao uso de cigarros eletrónicos, com e sem nicotina, assim como aos locais onde é permitido fumar. Pretende-se que haja cada vez menos restaurantes, hotéis e discotecas onde se possa fumar. Em relação aos espaços onde se pode fumar, estes devem ter mais de 100m² e devem, de acordo com a nova legislação, ter pressão negativa, para que dessa forma possa ser evitada a propagação do fumo.

Em 1931, numa palestra sobre o consumo de tabaco em Portugal, Moitinho D’Almeida, em modo de conclusão, referiu que o “consumo de tabaco é um vício, mas um vício brando e útil”. A verdade é que se torna útil para o Estado Português, que através do imposto sobre o tabaco, que aumenta anualmente, encaixa dinheiro nos cofres, no entanto para quem consome, não é de todo um vício brando (9).

3. Marinha Portuguesa

“Contribuir para que Portugal use o mar”.

Tendo como missão o combate à pirataria, o resgate de cidadãos nacionais de territórios em situação de conflito, ações de busca e salvamento marítimo, investigação científica no apoio ao projeto de expansão da plataforma continental portuguesa, entre muitas outras, este ramo das Forças Armadas é dotado de autonomia administrativa, integrada na Administração do Estado através do Ministério da Defesa Nacional. Integra missões em articulação com outros ramos das Forças Armadas por intermédio do Estado-Maior-General das Forças Armadas.

Foram muitas as batalhas em que a Marinha Portuguesa esteve envolvida ao longo dos mais de 900 anos que marcam a sua existência. Batalhas que marcaram a história do nosso país como o Combate Naval no Rio Minho em 1128, a Batalha Naval do Tejo em 1385, ou a Operação Mar Verde em 1970, ao largo da Guiné-Bissau, no âmbito da Guerra Colonial Portuguesa, assim como tantas outras.

Diariamente a Marinha Portuguesa desenvolve a sua atividade operacional recorrendo a vários meios, sejam eles Navios, Submarinos, Helicópteros, ou às Forças Especiais da Marinha, os Fuzileiros, e aos Mergulhadores.

Além da responsabilidade que tem para com o país, a Marinha Portuguesa tem responsabilidades para com os militares que servem este Ramo das Forças Armadas. O tipo de trabalho exercido pelos militares, e por algumas especialidades em particular, faz com que passem grande parte da sua carreira militar fora do seu ambiente familiar. O trabalho stressante, por turnos, com

carga horária elevada, podem muitas vezes levar ao início do consumo de substâncias psicoativas. O abuso destas substâncias por parte dos militares pode trazer consequências ao nível da segurança do pessoal, das instalações, assim como riscos para a saúde, que podem interferir com o exercício da atividade profissional dos militares (24).

É importante referir que as consequências negativas para a saúde dos indivíduos, resultantes de condições psicossociais adversas, como foram referidas anteriormente, variam de acordo com as características de cada indivíduo. Dois militares que exerçam as mesmas funções podem reagir de forma diferente ao stresse, à insatisfação laboral, aos problemas relacionais, etc (25).

Em 1982 o Valm Gabor Ziegler Patkozy escreveu, a propósito do consumo de substâncias lícitas e ilícitas em ambiente laboral: "Lembrem-se no entanto que nos termos do despacho de 18 de Janeiro de 1982 do Almirante CEMA o consumo de drogas deve ser encarado como um problema de saúde, em que o prevaricador necessita mais de ajuda que de ações punitivas." (Diretiva VALM SSP, 2011).

Tendo consciência da realidade do consumo existente entre os militares e na impossibilidade de a ignorar, na década de 70 as Forças Armadas começam, tal como os EUA, a desenvolver um Programa, que posteriormente, em 1994, a Organização Mundial de Saúde e a Organização Internacional de Trabalho entenderam ser a metodologia mais adequada para as organizações empregadoras, os "Employee Assistance Programmes" (EAP) baseados em toxicologia analítica para álcool e outras drogas.

As medidas de prevenção estabelecidas pela Armada no programa de controlo ao consumo, aprovado pelo Estado-Maior da Armada em 1 de Junho de 1976, levaram à criação do Laboratório de Análises Fármaco-Toxicológicas da Marinha, em 8 de Julho de 1980 (26). Com a criação do laboratório seria mais fácil controlar os casos já referenciados e, através de análises de rotina, conseguir um efeito dissuasor do consumo. Sete anos depois, em 1987 foi criada uma Unidade de Reabilitação Biopsicossocial, que introduziu, pela primeira vez no país, o “Modelo Minnesota”. Inicialmente a funcionar no Hospital da Marinha, em 1993 inicia o seu funcionamento a UTITA, Unidade de Tratamento Intensivo de Toxicodependências e Alcoolismo, sendo que esta unidade serve os três Ramos das Forças Armadas, encontrando-se sediada na Base Naval de Lisboa.

Ainda em 1987, surge, sob liderança da Medicina Psiquiátrica da Marinha, a planificação para o Curso de Operadores de Prevenção de Alcoolismo e Toxicodependência, na Escola de Serviço Militar, sendo o corpo docente constituído por militares dos três Ramos e por entidades externas às Forças Armadas para a Educação e Formação Profissional das Chefias, já que estas têm um papel importante no Programa de Prevenção.

Com o crescente desenvolvimento de atividades preventivas no combate à toxicodependência por parte dos três Ramos das Forças Armadas, e pela necessidade de uniformizar todas as ações, foi criado o Gabinete de Combate à Droga nas Forças Armadas, por deliberação do Conselho de Chefes de Estado-Maior, no EMGFA, em 13 de Março de 1979. Já em 1988, o mesmo Conselho aprova o “Programa para a Prevenção e Combate à Droga e

Alcoolismo nas Forças Armadas”. Este programa visa não só uniformizar os procedimentos dentro dos três Ramos, como regulamentar o fornecimento de informação referente a cada Ramo para os restantes, assim como dinamizar áreas de ação militar específicas, como a segurança militar, a educação e formação, a medicina preventiva, entre outras.

Este Programa intervém a três níveis: inicialmente ao nível das Unidades/Estabelecimentos/Órgão de colocação dos militares, posteriormente ao nível dos Laboratórios de Toxicologia, hospitais e centros de saúde militar, e por fim, ao nível das unidades especializadas no tratamento e reabilitação.

Semanalmente chegam ao LAFTM dezenas de amostras provenientes das várias unidades da Marinha, dos restantes Ramos das Forças Armadas, e de outras entidades militarizadas ou civis.

O grande volume de amostras que chegam ao laboratório, provenientes das várias Unidades da Marinha, resultam de uma escolha aleatória, efetuada semanalmente, com o objetivo de controlar e prevenir o início do consumo. Em menor volume, mas não menos importantes, chegam também ao Laboratório amostras de indivíduos já referenciados por consumo, ou amostras de entidades externas para confirmação de resultados positivos na triagem de substâncias psicotrópicas.

3.1. Mergulhadores

“Nadadores portugueses, nadando debaixo de água, atacam navios Espanhóis fundeados no rio Tejo procurando danificar-lhes o casco”.

Esta referência histórica, que data de 1580, parece ser a primeira referência à ação de mergulhadores no país. A primeira referência a um diploma que regula a atividade dos mergulhadores na Armada surgiu em 1899, sendo que em 1913 são promulgadas as primeiras “disposições relativas ao serviço dos mergulhadores da Armada”. São vários os acontecimentos em que os mergulhadores são solicitados para prestar serviços, no entanto aquele que ficou na memória da grande maioria dos cidadãos foi a tragédia de Entre-os-Rios, em Março de 2001.

Em 1972, e por necessidades operacionais, foram criados os Destacamentos de Mergulhadores, cujas unidades estão sediadas na Esquadrilha de Submarinos da Base Naval de Lisboa, sob o comando administrativo da mesma e sob o Comando Operacional do Comando Naval.

Ao Destacamento de Mergulhadores Sapadores nº1 cabem funções ligadas ao mergulho militar, como o reconhecimento e inativação de engenhos explosivos, ações de vistoria a cais de desembarque e obras-vivas de navios, etc.

O Destacamento de Mergulhadores Sapadores nº2 opera em situações de catástrofe, acidente ou calamidade, dando apoio à Proteção Civil, colabora também com as entidades responsáveis pela fiscalização das atividades económicas, assim como entidades responsáveis pelo estudo científico do meio aquático, etc.

O Destacamento de Mergulhadores Sapadores nº3 está envolvido em ações de limpeza dos portos e canais de acesso de minas e destroços, efetua busca e análise de fundos onde se suspeita haver ameaça de minas, etc.

Por fim, e não menos importante, a Escola de Mergulhadores, cuja missão assenta na formação de mergulhadores, militares e civis, participa em atividades de interesse público, como socorro a náufragos (27).

Sendo a população de Mergulhadores uma das populações alvo deste estudo, torna-se importante expor alguns conceitos ligados à fisiologia do mergulho e perceber de que forma o consumo de nicotina pode interferir no desempenho destes militares.

Quem pratica mergulho, seja de forma profissional ou desportiva, deve, antes de mais, perceber que o seu corpo não está preparado para sobreviver em ambiente aquático, que a forma como ouvimos ou vemos debaixo de água é diferente, que o corpo é submetido a pressão que tem efeitos fisiológicos, que podem variar entre os indivíduos (28).

É muito importante que o mergulhador tenha consciência de como funciona o seu corpo, principalmente no que diz respeito aos sistemas respiratório e cardiovascular, já que ocorrem alterações fisiológicas que não são visíveis, e que podem passar despercebidas.

3.1.1. Efeitos fisiológicos do mergulho nos sistemas cardiovascular e respiratório

O sistema cardiovascular é constituído por diferentes tipos de vasos que variam de acordo com a sua constituição e a sua função. Nas artérias, de maior calibre quando comparadas com as veias, o sangue circula com uma maior pressão e são responsáveis pelo transporte de sangue desde o coração até à periferia do corpo, enquanto as veias fazem o transporte inverso, algumas

vezes dependente de fatores extrínsecos, nomeadamente da pressão. Os capilares representam a meta da circulação, já que são os responsáveis pelas trocas diretas entre o sangue e os tecidos (14, 29).

O transporte de oxigénio é efetuado pela hemoglobina, proteína tetramétrica presente nos eritrócitos, composta por um grupo heme por subunidade. Este grupo, por sua vez, é constituído por uma protoporfirina e um átomo de ferro central, ligado aos quatro azotos da molécula. Esta proteína, quando desoxigenada, apresenta uma conformação mais rígida, denominada por forma T, na qual o grupo heme, que se encontra numa bolsa hidrófoba, está pouco acessível ao solvente, dificultando a ligação do oxigénio. Por outro lado, quando oxigenada a hemoglobina apresenta uma conformação mais flexível, designada por forma R. Esta ligação entre o oxigénio e a hemoglobina depende da existência, ou não, de oxigénio nas outras subunidades. Apesar de existir uma cooperatividade entre a hemoglobina e o oxigénio, o monóxido de carbono tem maior afinidade com a hemoglobina, cerca de 250 vezes superior. A afinidade da hemoglobina com o oxigénio pode também ser afetada pelo pH do meio, pela pressão (14).

Relativamente ao sistema respiratório, este é constituído pelas vias aéreas e pelos pulmões. As vias aéreas são compostas por uma série de canais, que do ponto de vista morfológico possuem diferentes diâmetros, estabelecendo a ligação com o exterior através das fossas nasais. Assim, fazem parte das vias aéreas as fossas nasais, a boca, a faringe, a laringe, a traqueia, os brônquios e os bronquíolos. À passagem pelas fossas nasais, o ar é humedecido, aquecido e, também filtrado. Após passar pela faringe e pela laringe, o ar chega à

traqueia, que faz a ligação entre a laringe e os brônquios, que por sua vez conduzem aos pulmões. A partir deste ponto os brônquios continuam a ramificar-se com consequente diminuição do seu calibre. Os brônquios principais originam os secundários que se dirigem para cada um dos lobos pulmonares, posteriormente dão origem aos brônquios terciários, que se ramificam formando os brônquios terminais, que como o nome indica se transformam em bronquíolos e finalmente em ramos alveolares. Desde a traqueia até aos bronquíolos, a superfície interna é revestida por cílios, que removem micropartículas. Por outro lado os alvéolos são revestidos por uma mucosa muito fina, o surfactante, e vasos em redor que permitem a hematose e evitam o colapso. Os pulmões, que do ponto de vista morfológico são diferentes, o direito é maior, constituído por três lobos enquanto o esquerdo tem apenas dois, são revestidos por uma membrana, a pleura. Os seus dois folhetos, o parietal e o visceral, formam uma cavidade virtual, que facilita os movimentos de expansão e contração dos pulmões. Abaixo da caixa torácica encontramos o diafragma, um músculo que quando contrai aumenta o volume torácico, assim como os músculos envolvidos no processo de respiração que podem elevar as costelas, aumentando o volume torácico, ou baixar as costelas e por conseguinte diminuir o volume (14, 30).

É ao nível do sistema respiratório que se verificam as trocas gasosas, quer entre a atmosfera e o corpo, quer entre a mistura de gases usada pelo mergulhador e o corpo. Este sistema é aquele que sofre as maiores alterações fisiológicas debaixo de água, comparando com o sistema cardiovascular ou

qualquer outro, já que a maioria dos efeitos fisiológicos está relacionada com os gases e com a pressão.

Por essa razão, existem alguns termos importantes relativos ao processo de respiração e das alterações que acontecem durante o mesmo, que o mergulhador deve conhecer quando está submerso, são eles: (30)

- **Volume corrente:** volume de ar que é trocado durante uma inspiração e uma expiração normais;
- **Reserva inspiratória:** quantidade de ar que pode ser inalado além de uma inspiração normal;
- **Reserva expiratória:** quantidade de ar que pode ser expirada além da expiração normal;
- **Volume residual:** quantidade de ar que permanece nos pulmões depois de uma expiração máxima;
- **Capacidade de reserva funcional:** quantidade de ar que permanece nos pulmões depois de uma expiração normal;
- **Capacidade inspiratória:** quantidade de ar que pode ser inspirado depois de uma expiração normal;
- **Capacidade vital:** quantidade de ar que pode ser inspirado após uma expiração máxima.

Quando a pressão de oxigênio diminui, os níveis de dióxido de carbono aumentam ou há variação do pH do sangue, são desencadeados estímulos que, de forma involuntária, estimulam o processo de respiração. Estas alterações fisiológicas são detetadas por quimiorrecetores que se encontram na carótida, aorta e medula. Relativamente ao pH do sangue, quanto mais

ácido, mais urgente se torna o início do processo de respiração, já que a diminuição do pH do sangue se deve ao aumento do nível de dióxido de carbono e, conseqüentemente, a uma diminuição do nível de oxigênio. Também a temperatura do sangue desencadeia o processo de respiração, nomeadamente quando a temperatura diminui (30).

Já debaixo de água, e ao nível dos alvéolos, o volume é reduzido, isto é, o volume ao qual os alvéolos fecham é menor comparando com uma expiração normal, já que a grande maioria permanece aberto em condições normais. Quanto ao volume residual, à reserva expiratória e à capacidade de reserva funcional sofrem um decréscimo. Por outro lado, a ação da pressão da água provoca o movimento de sangue para o tórax, nomeadamente vindo dos membros, e provoca uma compressão ao nível abdominal que obriga o diafragma a subir, o que diminui a expansão dos pulmões. O deslocamento vascular que ocorre durante o mergulho aumenta o retorno do sangue para o coração, o que leva a um aumento do débito cardíaco, do qual resulta o aumento da pressão arterial pulmonar (30-31).

A grande maioria das alterações fisiológicas que o mergulhador pode experimentar durante o exercício das suas funções estão fundamentalmente ligadas à pressão, como foi referido, e à escolha da mistura de gases utilizada durante o mergulho. Esta escolha deve ser consciente já que existe a preocupação da toxicidade dos gases, da descompressão e da densidade do gás, as questões térmicas, do custo associado à escolha dos gases e, por fim, a narcose.

A escolha dos gases obriga ao conhecimento das suas características, de como eles interagem, assim como das leis dos gases: Lei de Boyle, de Dalton e de Henry.

Assumindo que o ar que nos rodeia tem 1 atmosfera (1atm) de pressão, para determinar o valor de pressão total em qualquer profundidade é necessário adicionar a pressão na superfície à pressão exercida pelo peso da água, isto é, por cada 10m de profundidade aumenta 1atm.

Ao contrário do que acontece nos sólidos e líquidos, os gases podem ser comprimidos pela pressão, e é isso que acontece nos pulmões dos mergulhadores. Quando a pressão aumenta uma 1atm, as moléculas dos gases são comprimidas diminuindo o volume que ocupam, o mesmo acontece com os pulmões, que a uma pressão de 2atm reduzem o seu tamanho para metade, no entanto a densidade do ar aumenta para o dobro. É aqui que entra a lei de Boyle, que diz que o volume é inversamente proporcional ao aumento da pressão e a densidade é proporcional ao aumento da pressão.

Se à pressão de 1atm o ar é constituído por 21% de oxigénio (O_2) e 79% de azoto (N), passamos a assumir o ar com uma pressão parcial (pp) de O_2 de 0,21 e uma pp de N de 0,79. De acordo com a lei de Boyle, a 2atm o ar é mais denso, como tal a pressão parcial de N será de $0,79pp \times 2atm$, e a pressão parcial de O_2 passa a $0,21pp \times 2atm$, e assim sucessivamente, o que os leva à lei de Dalton, que mostra que a soma das partes compõe o todo.

O nosso corpo está em equilíbrio, ou seja, à superfície, a pressão parcial do O_2 e do N nos pulmões é igual à pressão parcial dos mesmos em qualquer outro tecido. Se em profundidade a pressão parcial dos gases sofre alterações, estas

serão as mesmas quer nos pulmões quer nos restantes tecidos do corpo e sangue, como provou Henry, que demonstrou que a quantidade de gás que se dissolve num líquido a determinada temperatura é diretamente proporcional à pressão parcial desse gás. Relativamente ao dióxido de CO₂, produto resultante do metabolismo, as regras são as mesmas dos restantes gases, e quando as suas pressões parciais são demasiado elevadas tornam-se tóxicos, no entanto a toxicidade pode variar entre indivíduos (30-31).

As pressões parciais de O₂, quando inferiores a 0,21bar, a 1atm, podem provocar hipoxia/anoxia. A hipoxia ocorre quando a pressão parcial de oxigénio está abaixo de 0,17 bar e por essa razão as funções fisiológicas não estão asseguradas. Pressão parcial abaixo de 0,10 bar pode provocar *blackout* ou até a morte do mergulhador. A anoxia define-se pela falta de oxigénio. Mas pressões parciais de O₂ acima de 1,6 bar podem provocar danos ao nível do sistema nervoso central, como náuseas, problemas de visão e audição, fadiga, confusão, ansiedade, falta de coordenação e convulsões. As convulsões podem ocorrer em qualquer altura, e podem facilmente levar ao afogamento.

Pressões parciais de CO₂, quando fora do intervalo normal, compreendido entre 35 e os 45 mmHg, podem provocar incapacidade física e mental. O consumo de drogas ilícitas e álcool pode aumentar o efeito narcótico do CO₂, e os efeitos negativos ao nível do sistema nervoso central (30). Se os efeitos narcóticos do O₂ e do CO₂ são conhecidos, o efeito narcótico do N ainda não está totalmente esclarecido. Sabe-se que os seus efeitos são essencialmente a nível cerebral, afetando a consciência do mergulhador, como se este estivesse anestesiado. Apesar de existirem várias teorias relacionadas com o tema, a de

Meyer-Overton gera consenso por parte dos fisiologistas. De acordo com esta teoria, quando mais lipossolúvel for o gás, maior o seu efeito narcótico, já que o tecido nervoso é rico em lípidos. O N provoca narcose porque afeta o espaçamento lateral das moléculas de lípidos, interferindo, assim, com a transmissão de impulsos nervosos ao longo das membranas celulares. O efeito narcótico do N provoca, entre outros sintomas, confusão, alucinações, sonolência, incapacidade de recordar partes do mergulho, etc.

Às alterações fisiológicas que já foram mencionadas, somam-se situações de hipotermia, hipertermia, insolação, sintomas associados à compressão de cavidades do corpo como nariz e ouvidos e, ainda, as questões associadas à síndrome de pânico (30).

Importa salientar que os Mergulhadores da Armada estão treinados para mergulhar até 81 metros de profundidade, razão pela qual se torna importante o conhecimento de todos os efeitos adversos causados pelo consumo de tabaco.

3.1.2. Impacto do consumo de nicotina no mergulho

Apesar de toda a informação disponível sobre os efeitos nocivos do consumo de tabaco, a maioria dos consumidores recusa-se a aceitar que tem problemas de adição, rejeita os riscos associados ao consumo, assim como os riscos inerentes à prática de mergulho. Independentemente do número de cigarros que o indivíduo fuma por dia, o consumo, mesmo que reduzido, tem sempre impacto na saúde do mergulhador, assim como no seu desempenho profissional.

São vários os estudos que demonstram os efeitos nocivos do consumo de tabaco, no entanto o mais extenso, o estudo de Framingham, que de forma contínua seguiu 5000 pessoas durante 34 anos, fornece dados estatísticos preocupantes (32).

Indivíduos com idades na casa dos 30 anos que fumam em média 15 cigarros por dia, diminuem a sua esperança de vida em 5 anos. Os fumadores aumentam em 20 vezes a probabilidade de desenvolverem cancro do pulmão, e aumentam também a probabilidade de desenvolverem cancro em outros órgãos, como boca, garganta, pâncreas, bexiga ou pele, uma vez que existem no tabaco, além da nicotina que é altamente aditiva e farmacologicamente bastante potente, álcoois aromáticos policíclicos que são cancerígenos. O consumo de tabaco aumenta, ainda, o risco de acidente vascular cerebral, e o consumidor pode, devido a problemas circulatórios, apresentar problemas de mobilidade ao nível dos membros inferiores, e por essa razão claudicar pontualmente. Por outro lado indivíduos que iniciam o consumo de tabaco na adolescência, cerca dos 14 anos, desenvolvem apenas 92% da função dos pulmões, sendo que esta perda da função é irreversível. (32)

Na prática de mergulho, as funções pulmonares devem estar asseguradas, uma vez que uma circulação que não seja eficiente não irá permitir a remoção dos gases inertes do sangue do mergulhador e não fornecerá aos músculos o O_2 de que necessitam. Também a presença de substâncias irritantes que provocam tosse, broncoconstrição e que inibem os cílios de atuarem e eliminarem as secreções, aumentam com o consumo de tabaco.

Sempre que o mergulhador fuma um cigarro está a inalar gases tóxicos entre os quais o CO (33). Tal como referido anteriormente, esta substância tem maior afinidade com a hemoglobina, competindo assim com o O_2 pela ocupação do grupo heme da molécula. Da ligação da hemoglobina ao CO resulta um composto denominado carboxihemoglobina, (COHb) (34). Nos não fumadores a concentração desta substância é de cerca de 0,5%, resultante da produção endógena de dióxido de carbono, produto resultante da decomposição da hemoglobina. No entanto nos fumadores esta concentração ronda os 15%.

Para perceber a problemática desta competição, é imperativo conhecer a curva de dissociação do O_2 .

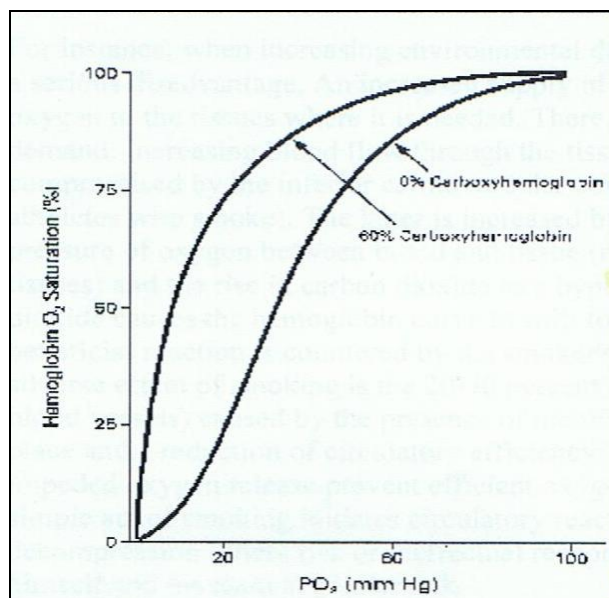


Figura 1: Curva de dissociação do Oxigénio (adaptado de Ranz, 2004).

Esta curva traduz a assimilação de elevadas quantidades de oxigénio, mesmo com baixas pressões de oxigénio nos pulmões. Apesar da afinidade da hemoglobina com o O_2 , existem fatores que podem influenciar o transporte de

O₂ desde os pulmões até aos tecidos. Maiores concentrações de CO₂ no sangue desencadeiam uma reação no organismo, como se houvesse insuficiente ventilação e consequentemente pouco O₂, o que leva a que haja uma maior necessidade de libertação O₂ para os tecidos.

Em referência à curva de dissociação, a necessidade de oxigenar os tecidos provoca um “desvio para a direita”, o que resulta numa maior libertação de O₂ para os mesmos.

Por outro lado, com o aumento de CO resultante do consumo de tabaco, a quantidade de O₂ libertado para os tecidos é reduzida, devido à presença de carboxihemoglobina, o que provoca uma mudança para a esquerda da curva de dissociação de oxihemoglobina.

A hipoxia provocada pelo consumo de tabaco leva a uma diminuição do transporte do O₂, e consequentemente ao aumento da produção de eritrócitos. Constituindo cerca de 35 a 40% do volume de sangue, com o consumo continuado de tabaco, verifica-se um aumento em cerca de 20% do volume, o que leva a um aumento da viscosidade do sangue e acarreta problemas circulatorios, que aumentam de gravidade com o aumento da pressão a que o mergulhador está sujeito durante a imersão.

Importa referir que, apesar de a maioria dos efeitos negativos provocados pelo consumo de tabaco se manifestarem a longo prazo, existem outras alterações cujos efeitos são detetados a curto prazo e que garantidamente podem comprometer a *performance* do mergulhador. Problemas cardíacos como arritmia, enfarte do miocárdio, AVC; redução da capacidade de absorção e

distribuição de oxigénio para as células; aumento do risco de doença de descompressão; alterações cognitivas, entre outros (32).

3.2. Guarnição de Submarinos

Foi antes da Primeira Guerra Mundial, em 1913, que Portugal recebeu o primeiro submersível, fazendo parte dos poucos países, a nível mundial, a poder tirar partido das vantagens deste meio naval. Estes meios têm capacidade para permanecer durante longos períodos em áreas de operações, sendo o seu raio de ação e mobilidade bastante alargados. Desde 2010 que a Marinha conta com mais dois submarinos, da Classe Tridente, no seu efetivo, que desta forma contribuem para a missão de vigilância da área marítima portuguesa e no combate ao terrorismo, entre tantas outras.

Quer o NRP Tridente, quer o NRP Arpão estão equipados com sistemas de navegação, de comando e controlo, de comunicações e defesa, o que permite reduzir a guarnição para apenas 33 elementos, em condições bastante favoráveis, que permitem a permanência em missões até 60 dias.

Apesar de todas as melhorias que os novos meios trouxeram para a Marinha Portuguesa, quer ao nível tecnológico quer operacional, estas mudanças podem ter repercussões negativas nos militares, nomeadamente no que diz respeito aos efeitos psicossociais ou ao stresse.

Os efeitos psicossociais, que segundo a OIT resultam de interações produzidas entre as pessoas e o trabalho que exercem, podem interferir nas suas capacidades, necessidades e condições de vida extralaboral (35). O avanço tecnológico permite reduzir o número de militares envolvidos em cada missão,

no entanto, estes continuam a exercer as suas funções por turnos, que podem ser rotativos, com uma carga horária que pode variar em função do tipo de missão, que além de provocar alterações fisiológicas decorrentes da privação do sono, e que podem levar ao início do consumo de substâncias lícitas para uso recreativo não terapêutico, nomeadamente de nicotina.

Por se tratar de um estimulante, aumenta o estado de vigília, da *performance* cerebral, tão necessária quando o indivíduo se encontra envolvido numa missão de âmbito militar e, principalmente, quando por alguma razão, se encontra a assegurar o turno sozinho, o que leva a um aumento da pressão e responsabilização de qualquer ação.

Este aumento da perceção de que se encontra sob pressão, aliada ao stresse daí resultante e ao facto de os indivíduos passarem longos períodos de tempo longe do seu ambiente familiar, podem ser suficientes para que os indivíduos comecem a manifestar sinais de stresse, o que leva a uma diminuição da sua capacidade de trabalho. Claro que cada individuo reage de forma diferente às condições de trabalho a que é submetido. Os comportamentos dos indivíduos perante as condições de trabalho dependem de fatores intrínsecos e extrínsecos. Entendem-se por fatores intrínsecos a idade, o sexo, a capacidade intelectual de cada individuo, a motivação. Por oposição os fatores extrínsecos estão ligados ao ambiente familiar e social em que se inserem, fatores culturais, etc. (25).

O consumo de nicotina por parte de militares que compõem a Guarnição de Submarinos pode ser encarada pelos mesmos como uma forma de controlo da ansiedade, no entanto estudos mostram que há uma relação entre o consumo

de nicotina e o aumento do estado de ansiedade. O consumo de nicotina e o fumo do cigarro afetam várias vias associadas ao desenvolvimento de estados de ansiedade, nomeadamente alguns sistemas de neurotransmissores, provoca stresse oxidativo, afeta a função mitocondrial, etc. (36). Por outro lado, os efeitos da abstinência do consumo, durante o longo período das missões operacionais pode trazer efeitos negativos, quer para o consumidor quer para a restante guarnição.

A irritabilidade resultante da abstinência, aliada ao facto de poderem ser privados das condições de liberdade a que estão sujeitos quando se encontram no mar, podem pôr em causa a segurança dos militares, das instalações, e originar algumas situações de conflito entre os indivíduos.

Uma forma de contornar esta situação será o recurso à terapia de reposição de nicotina (37), seja com recurso a pastilhas nicotina ou adesivos transdérmicos de nicotina.

Estudos revelam que o recurso de pensos transdérmicos pode ser uma boa opção, no entanto, verifica-se que a entrada da substância na corrente sanguínea acontece mais tarde, cerca de 4 horas depois, quando comparada com o consumo de um cigarro. Por outro lado há uma libertação prolongada de nicotina a partir do sistema já que se verificou uma concentração constante (38). À semelhança do que acontece com o consumo de tabaco, a quantidade de cotinina detetada é superior à da nicotina, devido ao tempo de semi-vida de ambas as substâncias.(39)

No entanto existem outras opções para tratamento de cessação tabágica como *sprays* orais, inaladores, no entanto uma boa opção será combinar o uso de

pastilhas com adesivos transdérmicos, isto para fumadores cujo consumo seja inferior a 15 cigarros/dia (39). Outra opção será recorrer a apoio médico, com recurso a ansiolíticos.

Muitos fumadores já recorrem ao uso dos cigarros eletrónicos no processo de cessação tabágica, com ou sem nicotina na sua composição. O recurso ao cigarro eletrónico com nicotina, quando comparado com o “placebo”, contribui, de forma bastante satisfatória, para a cessação do consumo (40). Esta seria uma boa opção para fumadores cujas missões se possam prolongar, e dessa forma evitar os efeitos negativos associados à abstinência.

4. Métodos analíticos de deteção, identificação e confirmação

Atualmente existem vários métodos utilizados na análise toxicológica que permitem detetar, identificar e quantificar cotinina em várias amostras biológicas. A escolha da técnica analítica a utilizar, depende não só do tipo de equipamento disponível no laboratório, mas também do tipo de matriz biológica, das características do analito em estudo e da finalidade a que se destina a análise. O método deve ser sensível, seletivo e específico, permitindo a obtenção de resultados inquestionáveis.

Num primeira fase, e de um modo geral, a análise toxicológica passa por uma análise de triagem, que permite verificar, de forma fácil e rápida, a existência ou não dos analitos em estudo, que serão posteriormente identificados e quantificados, com recurso a técnicas analíticas de confirmação e quantificação adequadas.

No que diz respeito à escolha da matriz biológica a utilizar neste estudo, por não levantar questões éticas e por se tratar das matrizes biológicas que fazem parte da rotina do LAFTM, foram utilizadas amostras de urina. A escolha desta matriz prende-se também com o facto de ser possível obter um maior volume de amostra, por ser composta em cerca de 98% por água, o que diminui o número de interferentes, e também porque se trata da matriz biológica que apresenta maiores concentrações de compostos e dos seus metabolitos, resultantes do processo de biotransformação. Em relação a outras amostras biológicas, como sangue ou saliva, na urina é possível quantificar cerca de 80 a 90% da nicotina absorvida pelo indivíduo (13).

Tabela 1: Concentração de cotinina quantificada em diferentes matrizes biológicas. (adaptado da Revista Brasileira de Toxicologia, nº 22 de 2009)

Referência	Tipo de exposição	Matriz biológica	Concentração de cotinina quantificada (ng/ml)
Moyer et al, 2002	Ativa	Urina	73 – 6680
Oddoze et al, 1998	Ativa	Urina	1460
	Passiva		± 50
Kuo et al, 2002	Ativa	Urina	3054,61
	Passiva		± 50
Machacek et al, 1986	Ativa (10 cig/dia)	Plasma	137,7
	Ativa (20 cig/dia)		302
	Passiva		2,1
Luck et al, 1984	Ativa	Plasma	16 – 330
		Leite	12 – 222
Schneider et al, 1997	Ativa	Saliva	279,3
Voncken et al, 1989	Ativa	Urina	2700
Voncken et al, 1989	Ativa	Plasma	194
Ji et al, 1999	Ativa	Urina	1060 ± 522
Kim et al, 2005	Ativa	Saliva	63,1 – 279,9
Allwright et al, 2005	Passiva	Saliva	0,1 – 30
	Ativa		>100
Man et al, 2006	Ativa	Urina	100 – 3550

4.1. Métodos de preparação de amostras

A análise de amostras biológicas por técnicas cromatográficas requer o pré-tratamento das mesmas, uma vez que podem tratar-se de amostras complexas, constituídas por compostos como proteínas, lípidos, sais, entre outros, que impossibilitam a análise direta através da técnica de cromatografia.

O pré-tratamento das amostras é, por isso, uma etapa muito importante, uma vez que permite o aumento da sensibilidade e da seletividade do método, através do isolamento e concentração do analito em estudo.

Os processos de pré-tratamento de cotinina habitualmente envolvem processos de extração líquido-líquido ou extração em fase sólida. Em ambas as técnicas é utilizada uma solução de extração, que permite concentrar o analito em estudo, razão pela qual a escolha da solução de extração é tão importante no processo de preparação de amostras que contém cotinina, já que se trata de uma substância instável e as concentrações quantificadas são da ordem dos ng/ml.

Apesar da extração em fase sólida ter evoluído muito ao longo das últimas décadas e ser das técnicas mais utilizadas na extração e concentração de analitos em amostras complexas, a extração líquido – líquido continua a ser uma excelente opção na preparação de amostras para determinação de cotinina.

A extração de cotinina em matrizes biológicas requer, numa fase inicial, a alcalinização do meio, recorrendo-se, para tal, a hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou carbonato de sódio, seguido da adição de um solvente orgânico. Habitualmente utiliza-se diclorometano como solvente orgânico, no entanto podem ser utilizados outros, nomeadamente uma mistura de solventes como acetato de n-butilo e diclorometano, que permite a obtenção de cromatogramas “limpos” assim como a evaporação mais rápida do solvente, ou simplesmente, 1-butanol (13). Nesta fase de preparação das amostras, deve também ser adicionado um padrão interno, o que minimiza os erros associados ao método analítico de confirmação.

Na tabela seguinte são apresentados algumas características da extração líquido-líquido.

Tabela 2: Características da extração líquido-líquido na preparação de amostras com cotinina.

(adaptado da Revista Brasileira de Toxicologia, nº 2 de 2009)

Referência	Matriz biológica	Analito em estudo	Solvente extrator	P.I.	Recuperação (%)
Parviainen et al, 1988	Urina	Cotinina	Butanol	S.R.	107%
Thuan et al, 1989	Urina	Cotinina	Clorofórmio	2-fenilimidazol	97%
Voncken et al, 1989	Plasma e urina	Cotinina	Acetato de n-butilo	n-etilnorcotinina	Urina: 81% Plasma: 69%
Hariharan et al, 1991	Urina	Cotinina	Diclorometano	n-etilnorcotinina	99%
Hagan et al, 1997	Urina	Cotinina	Éter dietílico	D3-cotinina	104%
James et al, 1998	Plasma e urina	Cotinina	Toxitubo A	D3-cotinina	S. R.
Ji et al, 1999	Urina	Cotinina livre e total	Acetato n-butilico: diclorometano	D3-cotinina	91,8%-96,2%
Shin et al, 2002	Urina, plasma e saliva	Cotinina	Éter etílico	Difenilamina	94% - 99%
Kuo et al, 2002	Urina e saliva	Cotinina	Clorofórmio	S.R.	S.R.
Moriya et al, 2004	Sangue e urina	Cotinina	Diclorometano	Maleato de carbonoxamida	S.R.
Man et al, 2006	Urina	Cotinina	Clorofórmio e metanol	Difenilamina	100,4%
Chadwick et al, 2007	Urina	Cotinina	Acetonitrilo	D3-cotinina	112%
Kowalski et al, 1978	Urina	Cotinina	Diclorometano	S.R.	94%

4.2. Métodos de deteção, identificação e confirmação

4.2.1. Método de rastreio

Os testes de rastreio são uma forma rápida de determinar de forma qualitativa a presença de um determinado composto numa amostra. Pelo elevado número de amostras que chegam ao LAFTM, o recurso a estes testes torna-se fundamental, já que permite realizar um rastreio inicial mais rápido e com elevada confiança nos resultados obtidos.

Os testes de rastreios mais utilizados em laboratório são os imunoensaios, isto é, são testes que assentam numa técnica imunológica baseada numa reação anticorpo-antigénio. Nesta reação os anticorpos produzidos têm afinidade estrutural para o analito (antigénio) a detetar na amostra e com uma forma marcada de antigénio, que irão competir com o anticorpo, o que permite a deteção da formação do complexo anticorpo-analito. Importa referir que estes testes imunológicos não detetam os analitos que possam estar presentes na amostra testada, eles detetam a existência de um analito cuja estrutura química é semelhante à do antigénio marcado que reage com o anticorpo, por essa razão, deve ser considerada a possível existência de interferentes e as amostras “supostas positivas” submetidas a testes de confirmação.

Atualmente são comercializados diversos testes de rastreio para várias substâncias cujo consumo é mais expressivo, cujas diferenças assentam essencialmente no tipo de antigénio marcado e no tipo de procedimento de deteção. No que diz respeito à cotinina, o método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é o mais utilizado (13).

4.2.2. Método de confirmação

Ao longo dos anos têm sido desenvolvidas diferentes técnicas instrumentais para deteção de cotinina em diferentes matrizes biológicas, entre elas a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC). Posteriormente estas duas técnicas surgiram acopladas a sistemas de deteção/identificação, a espetrometria de massa (MS). Estas duas técnicas cromatográficas permitem a separação dos vários compostos existentes na amostra, sendo que os analitos são distribuídos por duas fases, a móvel e a estacionária. No caso do GC a fase móvel é um gaz inerte, no caso do LC a fase móvel é um líquido.

A nível laboratorial, e no caso específico do LAFTM, a técnica analítica utilizada na confirmação de cotinina é a Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrometria de Massa (GC-MS).

A escolha desta técnica assenta no facto de haver necessidade de adaptar a análise aos recursos existentes no laboratório onde a presente dissertação foi desenvolvida, mas também por se tratar de uma técnica bastante utilizada no âmbito da toxicologia forense. Trata-se de uma técnica rápida, sensível, no entanto as amostras devem ser estáveis e voláteis, para que o processo seja mais simples, menos moroso e complexo.

4.2.2.1. Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrometria de Massa

O princípio básico da cromatografia assenta na separação de componentes presentes numa mistura, de acordo com as suas características físicas, como volatilidade, carga, peso molecular, solubilidade ou adsorção (41). Existe uma fase estacionária que pode ser líquida ou sólida e uma fase móvel constituída

por um líquido ou por um gás. No caso da cromatografia gasosa a separação das substâncias ocorre na coluna cromatográfica e ambas as fases estão envolvidas no processo. A fase estacionária que reveste a coluna cromatográfica, neste caso capilar, e a fase móvel, o gás inerte, hélio, move-se sobre a fase estacionária. A mistura a injetar deve ser volátil ou semi-volátil, não deve apresentar ponto de ebulição superior a 300°C e deve ser termicamente estável. Quando injetada, a amostra percorre toda a coluna, sendo que durante esse percurso os diferentes componentes da amostra são separados. A coluna capilar apresenta vantagens relativamente às colunas empacotadas: o maior comprimento da coluna permite uma maior eficiência, uma maior separação dos compostos, uma análise mais rápida. No entanto, dado o seu diâmetro reduzido, verifica-se uma menor passagem de amostra e satura rapidamente. O tempo decorrido desde a injeção da amostra até à altura máxima do pico denomina-se tempo de retenção. Este tempo é característico das propriedades do analito e das condições cromatográficas, como tal permite a identificação da substância analisada. A deteção/identificação foi a espectrometria de massa. Quando o analito sai da coluna, é “fragmentado” por ionização, sendo que esses fragmentos possuem uma relação massa/carga (m/Z), de acordo com as características do analito permitindo a identificação da substância, como se se tratasse da impressão digital da molécula. Na figura 2 está representado o sistema de GC-MS (42).

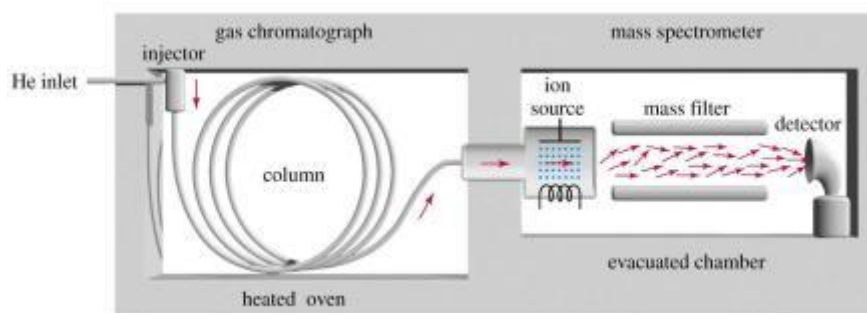


Figura 2: Diagrama do sistema GC-MS

Importa referir que a escolha do gás de arrastamento deve ser compatível com o equipamento e com o objetivo do estudo.

A vantagem do equipamento utilizado para o método de confirmação utilizado assenta no fato de ser um quadropolo, permitindo realizar a análise em modo SIM e em SCAN. Quando a análise ocorre em modo SIM, existe a possibilidade de seleccionar o ião a detetar, já em modo SCAN, são seleccionados intervalos de M/Z e todos os fragmentos iónicos dentro desse intervalo são analisados.

5. Validação do Método Analítico

A validação de um método analítico deve ser encarado como um processo que envolve manipulações, às quais podem ser associados erros, sejam eles de natureza sistemática ou aleatória, que podem alterar o resultado final da análise. O objetivo da validação de um método por parte de um laboratório prende-se com a necessidade de apresentar resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida. Não existe um único protocolo para a validação. Os parâmetros a determinar dependem da complexidade do ensaio, da sua natureza (qualitativo ou quantitativo) e principalmente do grau de validação a

que o ensaio tenha sido submetido no passado, tanto a nível interno como externo. De acordo com o disposto na norma NP EN ISO/IEC 17025, o laboratório deve proceder à validação do método sempre que se verifiquem alterações de métodos normalizados, sempre que um método é criado e desenvolvido pelo próprio laboratório, sempre que o método seja aplicado em ensaios que não se encontram descritos na literatura para aquele fim, entre outros (43).

Antes de proceder à validação do método analítico, devem ser estabelecidas as etapas do processo, nomeadamente no que diz respeito:

- Definição dos objetivos a atingir;
- Seleção do método a validar;
- Desenvolvimento dos conhecimentos teóricos do método;
- Determinação dos parâmetros de validação (exatidão, repetibilidade, precisão intermédia, especificidade, limite de quantificação e de deteção, linearidade, percentagens de recuperação, arrastamento e se possível, a reprodutibilidade) (44);
- Registo dos resultados da validação;
- Descrição e documentação pormenorizada do método.

No que diz respeito à escolha do método analítico a validar, esta deve ocorrer por forma a respeitar os requisitos de desempenho estabelecidos e recomendados pela comunidade científica, sustentados em estudos científicos de validação e publicados em revistas científicas internacionais. O conhecimento profundo dos princípios teóricos do método é essencial para uma boa programação das atividades de validação.

Os parâmetros de validação típicos são a exatidão, repetibilidade, precisão intermédia, especificidade, limite de quantificação e de detecção, linearidade, arrastamento e reprodutibilidade. Na tabela seguinte estão descritos os parâmetros a avaliar, de acordo com o tipo de análise pretendida.

Tabela 3: Parâmetros de validação do método

Parâmetro	Triagem Qualitativa/Quantitativa	Confirmação Qualitativa	Confirmação Quantitativa
Especificidade/seletividade		✓	✓
Capacidade de identificação		✓	✓
Limite de detecção		✓	✓
Carryover/arrastamento	✓	✓	✓
Repetibilidade	✓	✓	✓
Precisão intermédia	✓		✓
Exatidão (Recuperação)	✓		✓
Limite de quantificação			✓
Linearidade			✓
Incerteza			✓

5.1. Parâmetros de validação

5.1.1. Especificidade / Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método discriminar um analito de interesse numa mistura complexa, sem interferências significativas dos outros componentes dessa mistura, sejam eles componentes de matriz, metabolitos, impurezas, produtos de degradação ou outros.

Os termos especificidade e seletividade são muitas vezes abordados como se se tratasse do mesmo termo. Na verdade o termo seletividade deve ser aplicado para métodos que respondem a vários analitos, devendo o termo

especificidade ser aplicado para métodos que respondem a um só analito. De acordo com esta definição, um método é específico quando for 100% seletivo.

Com o objetivo de provar a seletividade de um método, recorre-se à análise a amostras de urina isentas do analito em estudo, no mínimo de um conjunto de 10 a 20 amostras. Simultaneamente alíquotas das mesmas amostras são fortificadas com o analito em estudo e analisadas. Pretende-se verificar a negatividade das amostras não fortificadas através da ausência de interferentes, mas também confirmar a positividade das amostras fortificadas.

A seletividade/especificidade é um parâmetro que deve ser continuamente validado. Esta validação contínua é efetuada através do estudo das interferências detetadas em amostras de rotina.

5.1.2. Capacidade de identificação

Diretamente relacionada com o parâmetro de seletividade, a capacidade de identificação assenta no estabelecimento de que um determinado sinal produzido durante a análise de uma determinada amostras corresponde ao analito em estudo. A possibilidade ou não de se verificar a presença de interferentes está relacionada com a seletividade do método, por essa razão estes dois conceitos se complementam. Na sequência da validação do parâmetro anterior, e recorrendo às mesmas amostras, é possível estabelecer a capacidade de identificação do método mediante o cumprimento dos critérios de confirmação, são eles: o tempo de retenção (TR), o tempo de retenção relativo (TRR), as áreas relativas aos iões em estudo e a relação massa/carga dos iões mais abundantes.

A diferença relativa de TRR, conforme expresso na equação 1, deve ser inferior ou igual a 1%, caso não seja utilizado um deuterado como padrão interno, ou inferior ou igual a 0,1%, quando o deuterado é utilizado.

$$\Delta TRR = \frac{TRR_{Suspeito} - TRR_{Controlo}}{TRR_{Controlo}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$TRR_{Suspeito}$ – Tempo de retenção relativo da substância na amostra

$TRR_{Controlo}$ – Tempo de retenção relativo da substância no controlo

ΔTRR – Diferença relativa de TRR

No que diz respeito à abundância relativa dos iões-diagnóstico em estudo, estes não devem diferir dos valores estabelecidos (tabela 4) relativamente às áreas relativas dos mesmos iões-diagnóstico nas amostras de controlo.

Tabela 4: Valores de tolerância máxima para as abundâncias relativas dos iões

Abundância relativa (% do pico base)	Tolerância (GC/MS)
> 50%	± 10% (absoluta)
25% a 50%	± 20% (relativa)
< 25%	± 5% (absoluta)

5.1.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) exprime o valor mínimo de concentração do analito que pode ser detetado e identificado numa amostra, mas não necessariamente quantificado como valor exato. O limite de detecção corresponde à menor concentração de substância que, com uma dada confiança, origina sinais analíticos que podem ser distinguidos do ruído de fundo.

O limite de quantificação (LQ) exprime o valor mínimo de analito que pode ser quantificado dentro de uma precisão e exatidão aceitáveis.

Existem várias formas de calcular o limite de detecção e quantificação. Uma das formas de determinar estes dois parâmetros de validação consiste no cálculo da razão S/N, que de uma forma geral deve ser igual ou superior a 3 e 10, respetivamente. Outra forma consiste no cálculo dos limiares a partir do estudo da curva de calibração, construída na região de LD e LQ estimados teoricamente. A Partir do estudo da regressão são aplicadas as seguintes equações:

$$LD = \frac{(3.3 \times S_{y/x})}{b} \quad \text{Equação 2}$$

$$LQ = \frac{(10 \times S_{y/x})}{b} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$S_{y/x}$ - é o desvio padrão residual da curva de calibração

b - é o declive da reta.

Este estudo pode ser efetuado através de valores de áreas absolutas ou áreas relativas, conforme o método sob validação.

Existe ainda uma outra forma de determinar o LQ que consiste na determinação do menor valor de concentração para o qual os valores de precisão e exatidão sejam $\leq 20\%$.

Na presente dissertação a metodologia adotada foi baseada no estudo da curva de calibração. Este parâmetro de validação será testado recorrendo à fortificação de amostras de urina brancas, com os analitos concentrados na concentração dentro dos valores estabelecidos.

5.1.4. Repetibilidade

A validação deste parâmetro permite analisar a aproximação entre resultados de medições sucessivas de amostras com as mesmas concentrações, realizadas nas mesmas condições, sejam elas pelo mesmo observador, com recurso à mesma instrumentação e ao mesmo procedimento, no mesmo laboratório, durante um curto período de tempo.

A reprodutibilidade deve ser calculada sobre os tempos de retenção e áreas de picos, obtidos da análise de controlos em diferentes gamas de concentração (baixa e alta). A partir dos dados obtidos para a substância em estudo, para cada replicado, é calculada a média, o desvio padrão (s) e o coeficiente de variação CV%).

De acordo com os critérios estabelecidos pelo LAFTM, para a repetibilidade do método, o CV% deve ser inferior a 10% para a gama alta e inferior a 20% para a gama baixa.

5.1.5. Arrastamento

Os fenómenos de arrastamento consistem num aumento do sinal ou aparecimento de um pico cromatográfico correspondente a uma substância que não devia estar presente na amostra, resultantes de vestígios de amostras injetadas anteriormente, ou que deveria aparecer numa concentração inferior. O estudo do arrastamento pode ser efetuado em conjunto com qualquer dos parâmetros descritos anteriormente. O estudo deve ser executado através da análise de amostras brancas, isentas de analito em estudo, intercaladas com amostras de gama média ou alta.

Em caso de existência de arrastamento, devem ser tomadas as medidas de controlo da qualidade consideradas adequadas para eliminar a possibilidade de arrastamento durante os métodos de confirmação.

5.1.6. Linearidade

Com a determinação da linearidade procura-se investigar se, num dado intervalo de concentrações, os sinais analíticos são diretamente proporcionais às concentrações utilizadas. É recomendável que sejam utilizadas pelo menos 5 concentrações diferentes para a construção da curva de calibração. Para validar este parâmetro de validação é necessário provar que o método é linear entre 50 a 200 % do valor de *cut-off*, se existente.

A avaliação visual da curva de calibração, o estudo dos residuais, seguido do cálculo do respetivo coeficiente de correlação (R^2) e o estudo da interceção na origem, permitem aferir a linearidade. As condições experimentais devem ser estabelecidas de forma a maximizar o valor de R^2 .

O método pode considerar-se linear se respeitar os seguintes critérios: os valores dos residuais apresentarem uma dispersão aleatória; o coeficiente de correlação apresentar um valor superior a 0,99; o intervalo de confiança da interceção incluir o valor 0.

O intervalo de linearidade deve, no mínimo, estar compreendido entre 50 % e 200 % do valor de *cutt-off* aplicável para o método.

5.1.7. Precisão e Exatidão

A precisão, expressa pelo seu desvio padrão (s) ou coeficiente de variação (CV - desvio padrão a dividir pela média) é uma medida da dispersão dos resultados obtidos sobre uma mesma amostra ou similares. Dependendo das condições em que se obtêm esses resultados definem-se os seguintes parâmetros:

Repetibilidade	Exprime a precisão dos resultados obtidos sobre uma amostra, aplicando o mesmo equipamento, recolhidos pelo mesmo técnico, no mesmo laboratório e em curtos espaços de tempo.
Precisão intermédia	Este parâmetro pretende simular a dispersão de valores em condições normais de funcionamento dum laboratório, isto é, mede a precisão dos resultados obtidos sobre uma amostra, em vários dias, por vários técnicos mas no mesmo laboratório.
Reprodutibilidade	Exprime a precisão dos resultados obtidos sobre uma amostra mas em laboratórios diferentes. Este

parâmetro só pode ser validado através de ensaios interlaboratoriais.

Depois de aplicado o procedimento de ensaio, os resultados obtidos são testados por aplicação da ferramenta ANOVA. Através desta análise para cada nível de concentração, podem ser obtidas as estimativas da variância da repetibilidade e da precisão intermédia, pela aplicação das seguintes equações:

Tabela 5: Tabela ANOVA “two factor fully-nested design”

Fonte	Mean square (MS)	Graus de liberdade
Dentro de grupos	$MS_{run} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{p-1}$	$p-1$
Entre grupos	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p(n-1)}$	$p(n-1)$
Total		$pn-1$

p é o número de sequências de análises de cada nível de concentração. Uma sequência para cada dia. n é o número de replicados em cada sequência. x_{ij} representa um replicado individual (replicado j) obtido na sequência i . \bar{x}_i representa a média de n replicados obtidos na sequência i , e finalmente, \bar{x} é a média das médias de p sequências.

Tabela 6: Cálculo das estimativas de precisão.

Precisão	Expressão
Repetibilidade (s_r)	$s_r = \sqrt{MS_r}$
Between-run precision (s_{run})	$s_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}}$
Precisão intermédia (s_l)	$s_l = \sqrt{(s_r^2) + (s_{run}^2)}$

No que diz respeito à exatidão, a grandeza principal a determinar neste estudo é a percentagem de recuperação do método, isto é a razão entre o valor observado (Cobs), e o valor esperado (Cspike), de forma a: investigar a existência de erros sistemáticos; definir fatores de correção, se relevante; estimar a incerteza associada à recuperação do método $U(\bar{R})$, como dado de entrada do procedimento de cálculo de incertezas.

A sua determinação depende da natureza do método e pode ser efetuada através da análise de materiais de referência certificados ou em amostras fortificadas.

$$R_i = \frac{C_{Obs\ i}}{C_{Spike}} \quad \text{Equação 5}$$

$$\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^p R_i}{p} \quad \text{Equação 6}$$

$$t_{Exp} = \frac{|1 - \bar{R}|}{U_{\% \bar{R}}} \quad \text{Equação 7}$$

$$U_{\% \bar{R}} = \frac{s_{obs}}{\sqrt{p}} \quad \text{Equação 8}$$

$$U_{\bar{R}} = \frac{U_{\% \bar{R}}}{\bar{R}} \quad \text{Equação 9}$$

$$U_{\bar{R}} = \frac{\sqrt{(U_{\% \bar{R}})^2 + \left(\frac{1 - \bar{R}}{k}\right)^2}}{\bar{R}} \quad \text{Equação 10}$$

t_{crit}: valor crítico bi-caudal para p-1 graus de liberdade e 95 % de confiança.

s_{obs} é o desvio padrão de p valores de *R_i* obtidos em condições de precisão intermédia. *R_i* é recuperação média de n replicados obtidos em condições de repetibilidade.

5.1.8. Recuperação

O estudo da recuperação tem por objetivo analisar a percentagem de analito que é recuperado da matriz biológica onde se encontra depois de lhe ser aplicado o método analítico, quando comparada com a quantidade de analito que se sabe estar presente na amostra. No fundo este parâmetro de validação analisa a eficiência do método de tratamento da amostra. Trata-se de um parâmetro relevante para amostras que sofrem processos de extração, uma vez que deve ser calculada experimentalmente a perda de analito devido ao processo de extração. O estudo da recuperação deve ser realizado a diferentes gamas de concentração, dentro das estabelecidas para os restantes parâmetros de validação. Para tal são preparadas amostras fortificadas a diferentes concentrações e amostras cuja fortificação ocorre apenas após o procedimento de extração ter ocorrido, isto é, antes da secagem do extrato. Para calcular a percentagem de analito recuperada recorre-se à seguinte equação:

$$\%R = \frac{Arel.Método}{Arel.s.extração} \times 100\% \quad \text{Equação 10}$$

O ideal será obter valores de recuperação próximos de 100%, no entanto valores ligeiramente abaixo, ou acima podem ser aceitáveis, desde que apresentem precisão e exatidão, tal como foi mencionado anteriormente na tabela 2.

5.1.9. Robustez

A robustez corresponde à capacidade de o método resistir a pequenas variações, sejam elas ao nível da temperatura ambiente, possíveis variações, ainda que mínimas, do pH, alterações resultantes da composição dos reagentes, entre outros. Estas variações devem ocorrer naturalmente durante o processo de validação do método, nomeadamente durante o estudo de parâmetros específicos, como a precisão, a exatidão e a capacidade de identificação do analito em estudo.

CAPÍTULO II - Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Pelo facto de não serem conhecidos estudos epidemiológicos relativos à prevalência do consumo de nicotina entre militares em Portugal, principalmente entre aqueles que exercem funções em que as alterações a nível fisiológico, provocadas pela nicotina têm um impacto negativo no desempenho, como é o caso dos Mergulhadores e da Guarnição de Submarino, este estudo permite conhecer a realidade do consumo.

Tratando-se de uma substância lícita para uso recreativo, cujo consumo está enraizado na sociedade, é provável que haja um elevado número de consumidores de nicotina/tabaco entre a população de estudo: Mergulhadores e Guarnição de Submarinos.

Os resultados obtidos serão um instrumento importante no âmbito das ações de informação, sensibilização e tratamento inseridas nas medidas do “Programa para a Prevenção e Combate à Droga e Alcoolismo nas Forças Armadas.”.

Por outro lado a elaboração deste trabalho permitirá implementar no Laboratório de Análises Fármaco-Toxicológicas da Marinha um método analítico que possibilitará a realização de futuros testes de rastreio, não só no âmbito militar mas também civil.

2.2.Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método para determinação de cotinina na urina por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS);
- Determinar a sensibilidade e a especificidade de um ensaio imunoenzimático a utilizar na análise de rastreio de cotinina na urina;
- Determinar a prevalência de militares que consomem nicotina/tabaco.

Nota: O método foi validado apenas para a cotinina, metabolito marcador do consumo de tabaco.

CAPÍTULO III - Material e Métodos

1. Reagentes e Padrões

O padrão de referência de cotinina, $C_{10}H_{12}N_2O$ (grau de pureza 99,26%) e o padrão interno d3-Cotinina, $C_{10}H_9D_3N_2O$ (grau de pureza 99,79%) foram fornecidos pela Logical[®], LGD Standards (Alemanha).

Ref do deuterado : rac-Cotinine-D3 1.0 mg/ml

Logical nº LGCAMP0517.81-01 lot nº 14560 (solução metanólica)

Ref do padrão (-)-Cotinine 1.0mg/ml

Logical nº LGCAMP0517.03-01 lot nº8393 (solução metanólica)

Os solventes orgânicos, Ter-butil-metil-eter ($C_5H_{12}O$), Diclorometano (CH_2Cl_2) e Metanol (CH_3OH) foram adquiridos à Scharlab S.L (Espanha).

O Acetato de Etilo ($CH_3COOC_2H_5$) foi adquirido Carlo Erba Reagents (França), e o Hidróxido de Sódio (grau de pureza >99%) foi adquirido à Sigma-Aldrich Corporation (Alemanha).

2. Preparação de Soluções e Padrões

2.1.Solução de cotinina a 10 µg/ml

A partir de uma solução padrão de cotinina a 1mg/ml foi preparada uma solução padrão de referência em metanol a uma concentração de 100 µg/ml e, posteriormente diluída para uma concentração final de 10 µg/ml.

2.2. Solução de Padrão Interno (10 µg/ml)

O padrão interno a 100 µg/ml foi preparado a partir de uma solução a 1mg/ml de d3-Cotinina em metanol. Por diluição foi preparado um padrão interno a 10 µg/ml.

2.3. Solução de Hidróxido de Sódio 12M

Para a preparação da solução de Hidróxido de Sódio a 12M, pesaram-se, numa balança analítica, 480g de NaOH, que foram transferidos para um balão volumétrico de 1000ml, ao qual se adicionou água destilada, cerca de dois terços do seu volume final. Por se tratar de uma reação exotérmica, deixou-se arrefecer a solução à temperatura ambiente. Agitou-se até dissolução completa e perfez-se o volume de 1000ml com água destilada.

2.4. Solução de extração

A solução de extração (solução extemporânea), uma mistura de Diclorometano + Acetato de Etilo + Ter-Butil-Metil-Éter (30:40:30), foi preparada num frasco de vidro de 500ml, ao qual foram adicionados, com a ajuda de provetas, 150 ml de Diclorometano + 200ml de Acetato de Etilo + 150 ml de Ter-Butil-Metil-Éter.

2.5. Amostras controlo de Gama Baixa e Gama Alta

Para a preparação dos controlos de gama baixa (200 ng/ml) e gama alta (400 ng/ml) foram usadas duas alíquotas de 3 ml amostra branca fortificadas, respetivamente, com 60µl e 120 µl de solução de cotinina a 10 µg/ml. A ambas as amostras adicionou-se ainda 120 µl de solução padrão interno (P.I.).

2.6. Amostra Negativa

Para a preparação da amostra negativa, utilizaram-se 3ml de amostra branca, aos quais se adicionaram 120 µl de solução de padrão interno (P.I.).

2.7. Branco de reagentes

O branco de reagentes foi preparado com 3ml de água em substituição da matriz de urina, ao qual se adicionou 120 µl de solução padrão interno (P.I.).

Na tabela 7 estão sintetizados os volumes de solução padrão de cotinina e de P.I. utilizados na preparação das várias amostras de controlo.

Tabela 7: Preparação de amostras de controlo, amostra negativa e branco de reagentes

	Amostra (3ml)	Padrão (Cotinina)	Padrão Interno (d3-Cotinina)
Amostra Controlo 200 ng/ml	Urina*	60 µl	120 µl
Amostra Controlo 400 ng/mL	Urina*	120 µl	120 µl
Amostra Negativa	Urina*		120 µl
Branco de reagentes	Água		120 µl

*urinas isentas do analito em estudo

2.8. Calibradores

Para a preparação dos calibradores de concentração 100 ng/ml; 120 ng/ml; 150 ng/ml; 180 ng/ml; 200 ng/ml e 400 ng/ml, foram usadas seis alíquotas de amostra branca, fortificadas com 30 µl; 36 µl; 45 µl; 54 µl; 60 µl e 120 µl de solução de cotinina a 10 µg/ml, respetivamente. Adicionou-se ainda a todas as alíquotas 120 µl de solução padrão interno (P.I.).

3. Materiais e Equipamentos

Para a preparação de soluções foi usado material de vidro de uso corrente em laboratório para medição de volumes (balões volumétricos e provetas).

Para o processamento das amostras foram usados os seguintes equipamentos: micropipetas de volume variável de 100 µl a 5000 µl da Eppendorf (Alemanha) e as respectivas pontas descartáveis; agitador de vórtex, Heidolph Rexel (Alemanha), balança analítica, modelo Sartorius Basic BA210S (Alemanha), centrifugadora, modelo Hettich Zentrifugen Rotina 45 (Alemanha); evaporador com corrente de azoto, modelo Zimark Turbo Vap LV (Alemanha); agitador rotativo, modelo Selecta Cod.3002512 (Espanha).

As amostras foram analisadas com recurso a um cromatógrafo gasoso, acoplado a espectrometria de massa (GC-MS), modelo Thermo Scientific Trace GC Ultra – DSQ II”, com injetor automático AS 3000.

4. Amostras biológicas

As amostras de urina branca utilizadas para o estudo da especificidade/seletividade reportam a urinas colhidas a militares voluntários, no âmbito das atividades do LAFTM, e que revelaram estar isentas de substância a pesquisar,

Relativamente às amostras objeto deste estudo foram utilizadas amostras de urina das seguintes populações:

- Uma população constituída por candidatos civis para admissão à Escola Naval;

- Uma população composta por militares selecionados de forma aleatória para rastreio toxicológico, no âmbito das medidas de prevenção do consumo, inseridas no “Programa para a Prevenção e Combate à Droga e Alcoolismo nas Forças Armadas.”;
- Uma população constituída por militares pertencente à Esquadilha de Submarinos, nomeadamente Mergulhadores e Guarnição de Submarino.

As amostras da população constituída por candidatos civis, num total de 158 indivíduos, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 17 e os 21 anos, foram utilizadas para validação do método de rastreio e validação qualitativa do método de confirmação.

As amostras da escolha aleatória entre militares dizem respeito a amostras provenientes de várias Unidades da Marinha, cujos militares são nomeados para despiste toxicológico. Esta população foi constituída por 120 militares, 97,2% do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 21 e os 59 anos. Esta população foi utilizada como amostra de controlo para comparação com a população de estudo.

A população de estudo foi composta por Mergulhadores e Guarnição de Submarino, militares pertencentes à Esquadilha de Submarinos, num total de 60 militares do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 22 e os 49 anos.

Todas as amostras foram colhidas em frascos de 100ml e conservadas a uma temperatura de -10°C até à sua análise.

5. Metodologia Analítica

Para o desenvolvimento da validação do método analítico de confirmação, foi fundamental a realização de uma revisão bibliográfica no que diz respeito ao tratamento das amostras biológicas, à substância de interesse e às técnicas de detecção existentes. A metodologia adotada foi ao encontro das condições existentes no LAFTM e aos objetivos traçados para o trabalho a desenvolver. Assim foi desenvolvida uma metodologia analítica para detecção e quantificação de cotinina em urina por GC-MS.

Posteriormente procedeu-se à realização de várias experiências para otimização do método, quer ao nível do tratamento das amostras quer das condições cromatográficas.

5.1. Condições cromatográficas

Inicialmente foram estabelecidas as condições cromatográficas seguindo os métodos de detecção já validados, para que dessa forma fosse possível identificar a substância em estudo, a cotinina, através do seu ião mais abundante (m/z 98) e tempo de retenção. Foram injetadas 10 soluções padrão de cotinina numa concentração de 200 ng/ml, concentração correspondente ao *cut-off* dos testes de rastreio utilizados neste trabalho.

A análise de resultados foi realizada com recurso ao *software Xalibur*.

Nas figuras 3 e 4 estão representadas as condições cromatográficas e do injetor. Mais detalhes das condições cromatográficas e do detetor de massa estão descritos no Anexo 1.

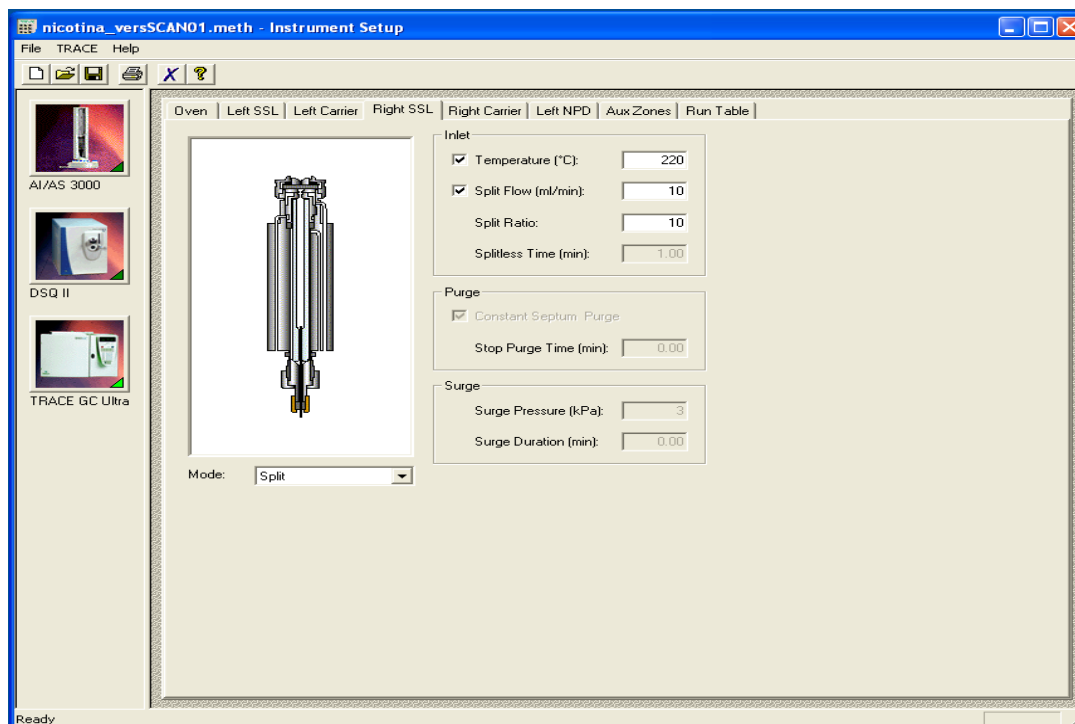


Figura 3: Condições do injetor

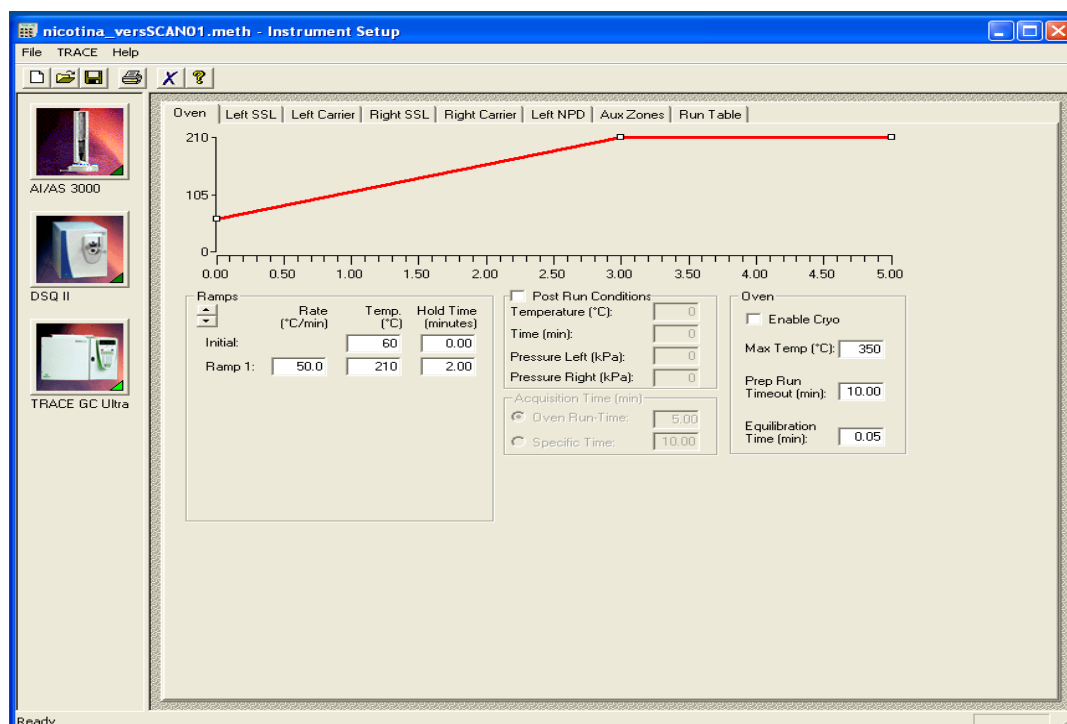


Figura 4: Condições cromatográficas

5.2. Processo de extração líquido-líquido

As amostras rececionadas no LAFTM foram armazenadas a -10°C , sendo necessário descongelá-las até atingirem a temperatura ambiente e proceder à sua homogeneização, por movimentos de inversão e rotação, antes da extração.

Atendendo às características da cotinina esta foi extraída a pH alcalino, tendo-se para o feito alcalinizado a urina com solução de NaOH 12M.

A extração foi realizada com uma solução de extração constituída por uma mistura de Diclorometano + Acetato de Etilo + Ter-Butil-Metil-Éter (30:40:30). Esta mistura permite obter cromatogramas limpos e promove a evaporação do solvente mais rapidamente.

5.2.1.Procedimento de extração

O processo de extração desenvolveu-se sequencialmente com as seguintes etapas:

1. Preparação de amostras controlo, amostra branca e branco de reagentes (conforme ponto 2 - Material e Métodos);
2. Preparação de amostras utilizando 3ml de urina;
3. Adição a todas as amostras e controlos:
 - 3.1. 120 μl de solução padrão interno (P.I.);
 - 3.2. 50 μl de solução de NaOH 12M;
 - 3.3. 2 ml de solução de Diclorometano + Acetato de Etilo + Ter-Butil-Metil-Éter (30:40:30).
4. Agitação das amostras em roller durante 10 minutos;

5. Centrifugação a 3000 rpm durante 6 minutos;
6. Separação e recolha da fase orgânica;
7. Evaporação da fase orgânica sob corrente de Azoto;
8. Redissolução do extrato com 80 µl de Acetato de Etilo;
9. Vortex;
10. Transferência para viais para análise.

6. Procedimento de validação do método de confirmação

A validação do método analítico para identificação e quantificação de cotinina em amostras de urina, por GC-MS, foi realizada de acordo com os critérios e normas estabelecidos pelo LAFTM. Os vários parâmetros de validação são descritos abaixo.

6.1. Especificidade / Seletividade

Para a avaliação da especificidade/seletividade foram utilizadas 10 amostras de urina brancas, colhidas a militares voluntários no âmbito das atividades do LAFTM.

Foram utilizadas duas alíquotas de 3 mL de cada uma das urinas. A uma das alíquotas (amostras fortificadas) adicionaram-se 60µl da solução padrão de cotinina 10 µg/mL (ver ponto 2.1. - Material e Métodos) e 120µl de solução de padrão interno (P.I.) (ver ponto 2.2. - Material e Métodos). À outra alíquota adicionou-se apenas solução de padrão interno (P.I.). A ambas as alíquotas foi aplicado o procedimento de extração descrito no ponto 5.2.1. do capítulo Material e Métodos.

6.2.Capacidade de identificação

Este parâmetro de validação foi realizado em simultâneo com o ponto 6.1., utilizando as amostras fortificadas para posteriormente calcular a percentagem de falsos negativos. Esta percentagem deve ser igual ou inferior a 10%.

6.3.Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

Apesar de existirem várias formas de determinar os limites de detecção e quantificação de cotinina, para a análise deste parâmetro foram preparados calibradores a partir de alíquotas de amostra branca fortificadas com as concentrações: 100; 120; 150; 180; 200 e 400 ng/ml de cotinina a partir de uma solução de cotinina a 10 µg/mL, às quais foi aplicado o procedimento de extração descrito no ponto 5.2.1. no capítulo dos materiais e métodos, e analisados por GC-MS nas condições descritas no ponto 5.1. do mesmo capítulo. Foi realizado o estudo de regressão da curva de calibração. Depois de se proceder à verificação da existência de pontos aberrantes, não rejeitando mais de 20% dos pontos, calcularam-se os limites de detecção e de quantificação a partir da regressão da curva.

6.4. Repetibilidade

Para o estudo deste parâmetro de validação foram fortificadas amostras de urina branca a duas gamas de concentração: 200 ng/mL (gama baixa - valor correspondente ao valor de *cut-off* da cotinina) e 400 ng/mL (gama alta - valor correspondente ao dobro do valor de *cut-off* da cotinina). A cada amostra

adicionou-se 120 µl de solução de padrão interno (P.I.), e aplicou-se o procedimento de extração anteriormente descrito.

6.5. Arrastamento

Para a validação deste parâmetro foram injetadas amostras brancas intercaladas com amostras controlo da gama alta (400 ng/mL), para detetar uma possível contaminação. Esta validação foi realizada em simultâneo com a validação do parâmetro da repetibilidade. (6.4)

6.6. Linearidade

Para a avaliação deste parâmetro de validação foram preparados calibradores para uma gama de trabalho de concentração entre 100 ng/ml e 400 ng/ml. Os calibradores foram preparados a partir de uma amostra branca fortificadas com solução de cotinina a 10 µg/mL para concentrações finais de: 100; 120; 150; 180; 200 e 400 ng/ml. Uma vez preparadas as amostras fortificadas, aplicou-se o procedimento de extração. Posteriormente foi realizado o estudo de regressão da curva de calibração. Apesar do procedimento ser, em tudo, idêntico ao procedimento escolhido para a análise do LD e LQ, a análise deste parâmetro de validação foi realizado em simultâneo com a análise do parâmetro da precisão e exatidão.

6.7. Precisão e Exatidão

Para este parâmetro foram analisadas, durante 5 dias, diferentes amostras controlo de gama baixa (200ng/ml) e gama alta (400ng/ml).

Os resultados foram tratados com recurso à aplicação da ferramenta ANOVA, a partir da qual foi retirada a estimativa da precisão intermédia

6.8. Recuperação

Para a análise deste parâmetro de validação selecionaram-se dois valores de concentração, gama baixa (200ng/ml) e gama alta (400ng/ml).

Para cada gama foram preparados dois conjuntos de três amostras brancas. Um conjunto foi fortificado com solução padrão de cotinina antes do processo de extração, enquanto o outro conjunto foi fortificado após o processo de extração e antes do passo de evaporação. A todas as amostras foi adicionado 120 µl de solução de padrão interno (P.I.) antes do passo de evaporação.

6.9. Robustez

Durante o estudo da precisão intermédia e da exatidão foram introduzidas pequenas variações de temperatura ambiental, manutenção do equipamento, alteração da micropipetas utilizadas, que permitiram avaliar a robustez do método

7. Análise de amostras reais

Uma vez terminada a avaliação dos principais parâmetros de validação procedeu-se à análise das amostras de urina colhidas a 60 militares, entre Mergulhadores e Guarnição de Submarino, da Esquadilha de Submarinos. Aquando da realização das colheitas, cada militar respondeu a um questionário (ver anexo II), no qual declarou o tipo de consumo, caso existisse, e se recorria ou não a medicação para cessação tabágica, entre outras informações.

8. Validação do método de rastreio (imunoensaio)

Tendo em vista a validação do método de rastreio por imunoensaio “Single-Sandwich”, em tira individual, *nal von minden Drug-Screen®*, para deteção qualitativa de cotinina. Foram utilizadas 50 amostras brancas. Foram utilizadas duas alíquotas de cada amostra branca, sendo que uma das alíquotas foi fortificada com cotinina numa concentração correspondente ao valor de *cut-off* (200 ng/ml) definido pelo fabricante. Todas as amostras, fortificadas e não fortificadas foram posteriormente submetidas a análise de confirmação por GC-MS.

CAPITULO IV – Resultados e Discussão

1. Validação do método de confirmação

Após serem reunidas as condições analíticas ideais para identificação e quantificação de cotinina em urina por GC-MS, descritas no capítulo anterior, procedeu-se à avaliação dos parâmetros de validação do método. São apresentados neste capítulo os resultados obtidos e respetiva discussão.

1.1. Especificidade / Seletividade

De acordo com o procedimento descrito no ponto 6.1. no capítulo Materiais e Métodos, foram utilizados dois conjuntos de 10 amostras brancas. Da análise por GC-MS das amostras negativas (não fortificadas) e positivas (fortificadas) e cujos resultados se encontram descritos na tabela 3, é possível verificar a negatividade das amostras não fortificadas, através da ausência de cotinina e de outros compostos que interfiram com o composto a identificar. Por outro lado, nas amostras fortificadas não se verificaram a existência de falsos negativos.

Nas figuras 5 e 6 estão representados, a título de exemplo, dois cromatogramas correspondentes a uma amostra positiva (fortificada) e uma amostra negativa (não fortificada).

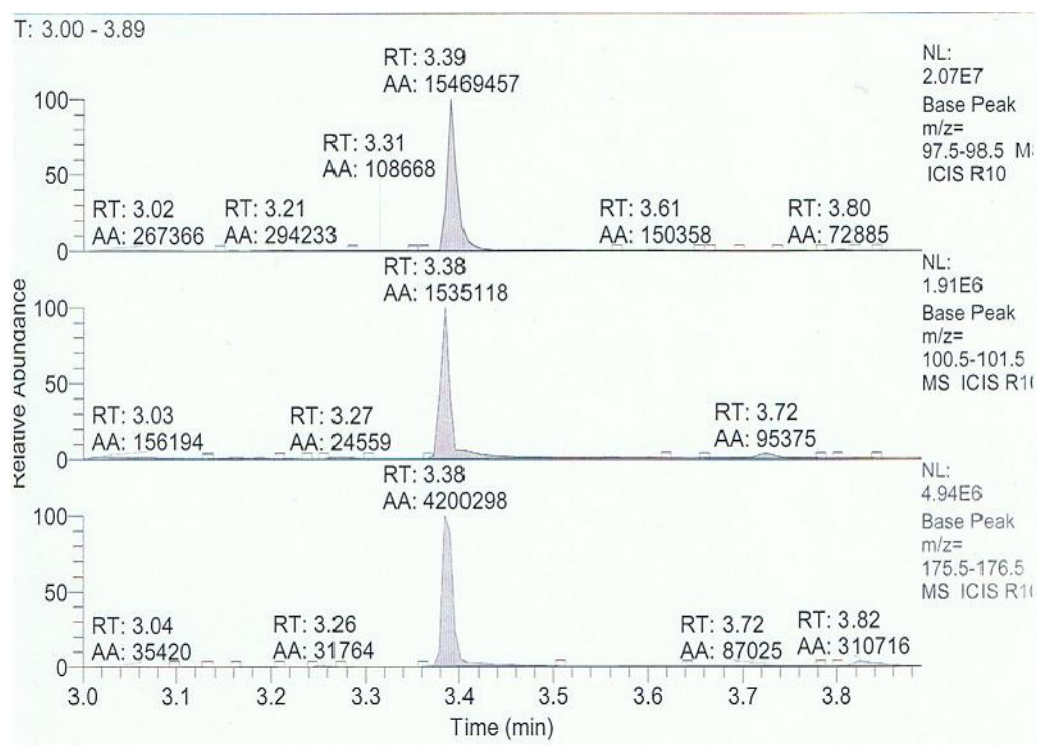


Figura 5: Cromatograma de uma amostra positiva

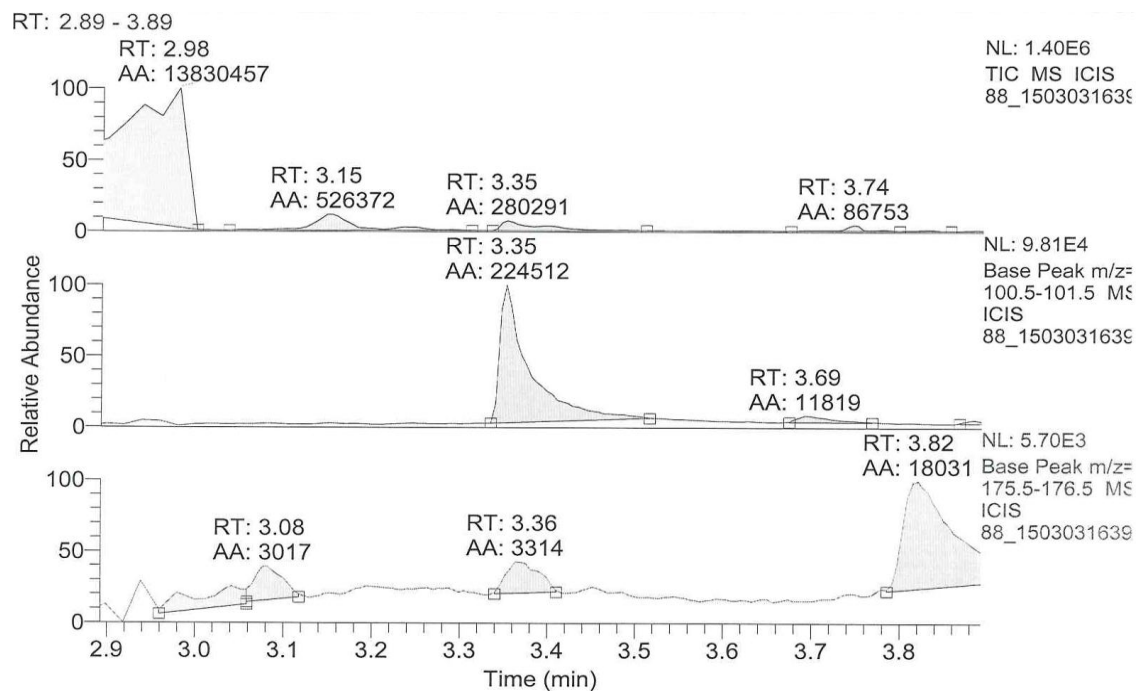


Figura 6: Cromatograma de uma amostra negativa

Tabela 8: Resultados obtidos para o parâmetro de Especificidade/ Seletividade

Amostra (negativas)	Resultado (GC-MS)	Interferências	Observações
2140271	Negativo	Sem interferências	Nada a observar
2140328	Negativo	Sem interferências	Nada a observar
2140333	Negativo	Sem interferências	Nada a observar
2140336	Negativo	Sem interferências	Nada a observar
2140340	Negativo	Sem interferências	Nada a observar
2140346	Negativo	Sem interferências	Nada a observar
2140347	Negativo	Sem interferências	Nada a observar
2140355	Negativo	Sem interferências	Nada a observar
2140367	Negativo	Sem interferências	Nada a observar
2140372	Negativo	Sem interferências	Nada a observar
PERCENTAGEM DE FALSOS POSITIVOS			0%
Amostra (positivas)	Resultado (GC-MS)	Interferências	Observações
2140271	Positivo	Sem interferências	Nada a observar
2140328	Positivo	Sem interferências	Nada a observar
2140333	Positivo	Sem interferências	Nada a observar
2140336	Positivo	Sem interferências	Nada a observar
2140340	Positivo	Sem interferências	Nada a observar
2140346	Positivo	Sem interferências	Nada a observar
2140347	Positivo	Sem interferências	Nada a observar
2140355	Positivo	Sem interferências	Nada a observar
2140367	Positivo	Sem interferências	Nada a observar
2140372	Positivo	Sem interferências	Nada a observar
PERCENTAGEM DE FALSOS NEGATIVOS			0 %

1.2.Capacidade de identificação

A identificação da cotinina foi estabelecida mediante a seleção dos íões mais abundantes: m/z 98 e m/z 176, assim como o tempo de retenção (TR)

esperado para a cotinina, o tempo de retenção relativo (TRR) inferior ou igual a 1% e as áreas relativas dos picos diagnóstico, de acordo com os intervalos de tolerância definidos. A tabela 4 apresenta os resultados da capacidade de identificação.

Tabela 9: Resultados do parâmetro Capacidade de Identificação

Amostra	Amostras				Amostra Controle				Diferença máxima admissível	T.R.R
	Abundância absoluta		Abundância relativa (%)		Abundância absoluta		Abundância relativa (%)		Diferença relativa	
	98	176	98	176	98	176	98	176		
2140271	598770	179095	100	29,9	1131189	291576	100	25,8	20,6-30,9	< 1%
2140328	1689164	374311	100	22,2	1131189	291576	100	25,8	20,6-30,9	
2140333	1139387	235875	100	20,7	1131189	291576	100	25,8	20,6-30,9	
2140336	788852	181778	100	23,0	1131189	291576	100	25,8	20,6-30,9	
2140340	1540343	333232	100	21,6	1131189	291576	100	25,8	20,6-30,9	
2140346	1049474	229372	100	21,9	1131189	291576	100	25,8	20,6-30,9	
2140347	634466	176126	100	27,8	1131189	291576	100	25,8	20,6-30,9	
2140355	881429	220650	100	25,0	1131189	291576	100	25,8	20,6-30,9	
2140367	882955	227618	100	25,8	1131189	291576	100	25,8	20,6-30,9	
2140372	2151675	510388	100	23,7	1131189	291576	100	25,8	20,6-30,9	

Para a totalidade das amostras fortificadas os critérios descritos anteriormente foram cumpridos na sua totalidade, satisfazendo os critérios estabelecidos pelo LAFTM.

1.3. Limite de Quantificação e Limite de Detecção

Conforme descrito no ponto 2.3 do capítulo Materiais e Métodos, para preparação de calibradores com concentrações: 100; 120; 150; 180; 200 e 400 ng/ml, foram calculados os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), a partir do estudo da regressão. De salientar que os calibradores cumpriam os critérios de identificação da substância em estudo, nomeadamente tempo de relação relativo e relação iónica dos iões estudados.

Tabela 10: Resultados obtidos para o estudo do LQ e LD

N	Controlo (X)	Área	PI	Ratio (Y)
1	100	2198148	1719885	1,2781
2	120	2319788	1785240	1,2994
3	150	2551766	1719582	1,4839
4	180	2698991	1704250	1,5837
5	200	2884466	1708153	1,6886
6	400	4309587	1805368	2,3871

Gráfico 1: Curva de calibração para o estudo do LQ e LD

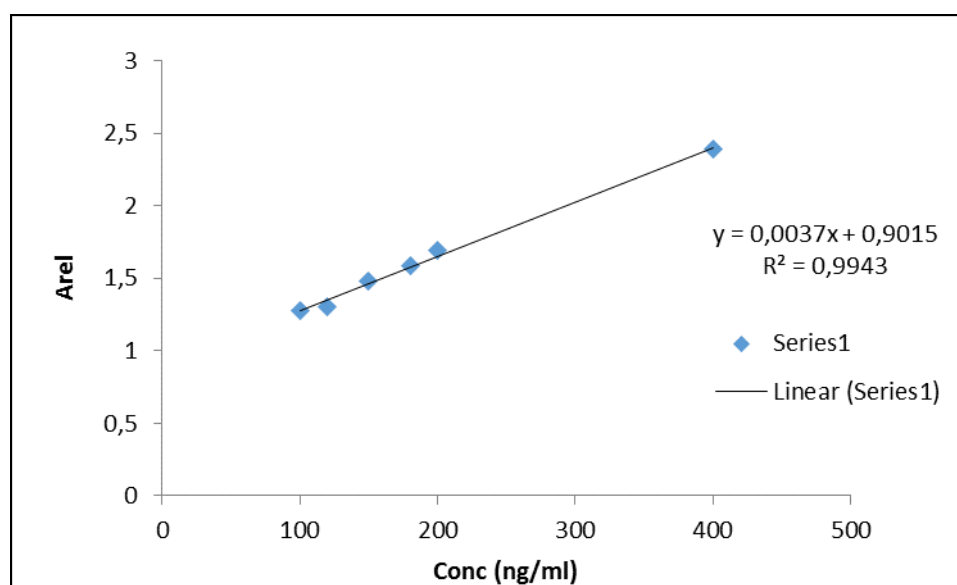


Tabela 11: Resultados obtidos para o estudo do LQ e LD, estatística de regressão

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997143121
Quadrado de R	0,994294404
Quadrado de R ajustado	0,992868004
Erro-padrão	0,034463025
Observações	6

Tabela 12: Resultados obtidos para o estudo do LQ e LQ, ANOVA

	GI	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,8279054	0,827905	697,06606	1,2231E-05
Residual	4	0,0047508	0,001188		
Total	5	0,8326562			

Tabela 13: Resultados obtidos para o estudo do LQ e LQ, estudo estatístico

	Coeficientes	Erro-padrão	Stat t	Valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,90146	0,030642	29,41901	7,949E-06	0,816381462	0,986533096
Variável X 1	0,00375	0,00014202	26,40201	1,223E-05	0,003355362	0,004143997

Tabela 14: Resultados obtidos para o estudo do LQ e LQ, resultado residual

Observação	Y previsto	Residuais	Residuais-padrão
1	1,2764252	0,00165323	0,053633433
2	1,3514188	-0,05199243	-1,686715057
3	1,4639092	0,02003629	0,650008375
4	1,5763996	0,00728294	0,236269979
5	1,6513932	0,03725295	1,208543485
6	2,4013291	-0,01423299	-0,461740215

A partir da curva de calibração foram determinados o LD e LQ, aplicando as seguintes equações:

$$LD = (3.3 \times S_{y/x})/b$$

$$LQ = (10 \times S_{y/x})/b$$

Onde:

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração
- b é o declive da reta

Foi estimado um valor de limite de detecção de 27 ng/ml e um valor de limite de quantificação de 82 ng/ml.

Os resultados referentes a este parâmetro estão descritos nas tabelas 11, 12, 13 e 14.

1.4. Repetibilidade

Após ser aplicado o procedimento descrito no procedimento 6.4. do capítulo Materiais e Métodos, foram obtidas as áreas relativas e os respectivos tempos de retenção para cada uma das amostras controlo, sendo que posteriormente foram calculados o desvio padrão, a média e o coeficiente de variação. Na tabela 15 são apresentados os resultados.

Tabela 15: Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade

Área				Área			
	Cotinina	Cotinina-d3	Área Relativa		Cotinina	Cotinina-d3	Área Relativa
CTR 200	872264	1633010	0,534145	CTR 400	1313269	1338721	0,980988
CTR 200	716319	1422463	0,503577	CTR 400	1713784	1766961	0,969905
CTR 200	1074367	2124149	0,505787	CTR 400	611401	583741	1,047384
CTR 200	1528490	2886585	0,529515	CTR 400	2269766	2195726	1,03372
CTR 200	309087	565911	0,546176	CTR 400	1640372	1625249	1,009305
CTR 200	1004073	2326130	0,43165	CTR 400	1271759	1273377	0,998729
CTR 200	570260	1010047	0,564588	CTR 400	2431985	2742284	0,886847
CTR 200	830732	1682372	0,493786	CTR 400	1561749	1647068	0,948199
CTR 200	442668	926698	0,477683	CTR 400	1711965	1751258	0,977563
Media			0,518861	Media			1,007999
S			0,03776	S			0,045765
cv(%)			7,277544	cv(%)			4,540185

Este método de confirmação apresenta coeficientes de variação de 7,2% e 4,5% respetivamente para gama baixa e para gama alta. Estes valores são inferiores a 10% cumprindo os critérios de validação do método definidos pelo LAFTM.

1.5. Arrastamento

De acordo com os cromatogramas obtidos nas amostras negativas foi possível verificar que não existe sinal da presença de analitos, como tal é possível afirmar que não existe arrastamento na gama testada.

1.6. Linearidade

Conforme descrito no ponto 6.6 do capítulo de Materiais e Métodos para o estudo do parâmetro da linearidade foram utilizados calibradores com concentração de: 100; 120; 150; 180; 200 e 400 ng/ml. Nas tabelas 16 a 20 e no Gráfico 2 são apresentados os resultados relativos á linearidade

Tabela 16: Resultados obtidos para o estudo da Linearidade

n	Controlos	Área	P.I.	Ratio (Y)
	(x)			
1	100	2235651	1687501	1,324829
2	120	2435651	1662690	1,464886
3	150	2672264	1673272	1,597029
4	180	2956822	1700910	1,738377
5	200	3090547	1691464	1,827143
6	400	4636859	1786803	2,595059

Gráfico 2: Curva de calibração para o estudo da linearidade

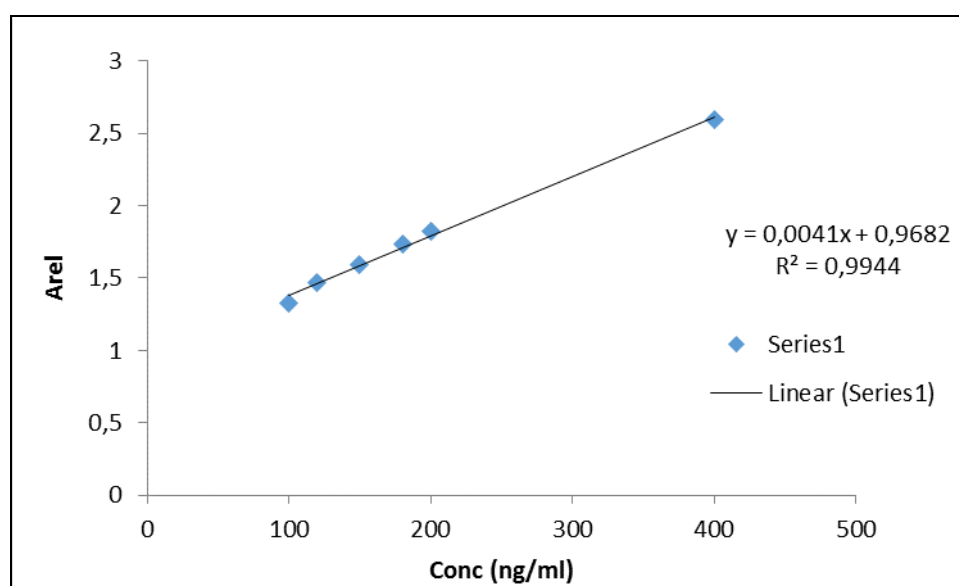


Tabela 17: Resultados obtidos para o estudo da linearidade, estatística de regressão

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997174466
Quadrado de R	0,994356915
Quadrado de R ajustado	0,992946144
Erro-padrão	0,037659595
Observações	6

Tabela 18: Resultados obtidos para o estudo da linearidade, ANOVA

	GI	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,999625	0,999625	704,8321	1,19642E-05
Residual	4	0,005673	0,001418		
Total	5	1,005298			

Tabela 19: Resultados obtidos para o estudo da linearidade, estudo estatístico

	Coeficientes	Erro-padrão	Stat t	Valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,96817489	0,033484151	28,91442	8,52E-06	0,875207983	1,061141797
Variável X 1	0,004120238	0,000155196	26,54867	1,2E-05	0,003689346	0,00455113

Tabela 20: Resultados obtidos para o estudo da linearidade, resultado residual

Observação	Y previsto	Residuais	Residuais-padrão
1	1,380198681	-0,05536924	-1,643796159
2	1,46260344	0,002282378	0,067758988
3	1,586210577	0,010818477	0,321177788
4	1,709817715	0,028558801	0,847850622
5	1,792222473	0,034920759	1,036723737
6	2,616270056	-0,02121117	-0,629714975

Verificando-se o cumprimento do parâmetro de R e dos residuais, comprovou-se que o método é linear entre 100 e 400 ng/mL.

1.7. Precisão e Exatidão

1.7.1. Precisão intermédia

Para o efeito foram preparadas amostras de controlo, em cinco dias diferentes. A partir da curva de calibração foram determinadas as concentrações dos controlos, cujos resultados são apresentados nas tabelas 21 e 22.

Tabela 21: Resultados para o estudo da precisão intermédia (200 ng/ml)

Conc. Teórica		200				
Nível 2	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	
Data	25-06-14	26-06-14	01-07-14	02-07-14	03-07-14	
Rep. 1	176,257	179,314	165,610	244,060	167,612	
Rep. 2	173,053	171,915	171,915	267,840	150,508	
Rep. 3	186,168	190,457	183,575	239,923	163,728	
Rep. 4	176,24	162,695	156,216	235,370	172,751	
Rep. 5	172,004	183,500	154,559	233,388	163,806	
Média	176,7	177,6	166,4	244,1	163,7	
CV%	3,2%	6,0%	7,2%	5,7%	5,0%	

Tabela 22: Resultados para o estudo da precisão intermédia (400 ng/ml)

Conc. Teórica		400				
Nível 2		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Data		25-06-14	26-06-14	01-07-14	02-07-14	03-07-14
Rep. 1		310,552	384,564	335,454	302,695	315,632
Rep. 2		307,609	329,180	382,260	307,664	329,180
Rep. 3		304,305	329,152	321,129	307,609	328,375
Rep. 4		305,138	335,759	317,326	304,694	335,759
Rep. 5		301,751	318,963	321,129	301,751	318,963
Média		305,9	339,5	335,5	304,9	325,6
CV%		1,1%	7,6%	8,1%	0,9%	2,5%

Os resultados deste parâmetro de validação foram tratados com aplicação da ferramenta ANOVA, através da qual foram extraídas as estimativas da repetibilidade e da precisão intermédia.

Nas tabelas 23 e 24 estão representados os valores de precisão intermédia.

Tabela 23: Valores obtidos no estudo da precisão intermédia – 200 ng/ml

TABELA ANOVA (200 ng/ml)		
Média	185,70	ng/mL
Repetibilidade	10,48	5,6%
Limite de repetibilidade	34,58	19%
Between-run	42,47	
Nº pontos	5,00	
Precisão intermédia	43,74	23,56%

Tabela 24: Valores obtidos no estudo da precisão intermédia – 400 ng/ml

TABELA ANOVA (400 ng/ml)		
Média	268,90	ng/mL
Repetibilidade	17,25	6,4%
Limite de repetibilidade	56,93	21%
Between-run	18,44	
Nº pontos	5,00	
Precisão intermédia	25,25	9,39%

De acordo com os dados obtidos é possível afirmar que a precisão intermédia varia entre 23,56% e 9,39%.

1.7.2. Exatidão

Este parâmetro de validação foi realizado em simultâneo com o parâmetro de precisão intermédia.

Na tabela 25 são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 25: Resultados obtidos no estudo da exatidão

Dia	200 ng/ml		400 ng/ml	
	Média	%	Média	%
1	176,74	88,4%	305,87	76,5%
2	177,58	88,8%	339,52	84,9%
3	166,38	83,2%	335,46	83,9%
4	244,12	122,1%	304,88	76,2%
5	163,68	81,8%	325,58	81,4%
Valor teórico		200 ng/ml	400 ng/ml	
Média		92,8%	80,6%	
S		0,16615	0,04058	
CV %		17,9%	5,0%	
N		5	5	
Incerteza de % R		0,0743	0,0181	
Texp		0,96	10,71	
Tcrítico		2,78	2,78	
Incerteza padrão relativa		8,00%	2,25%	

Para os dois níveis de concentração, a percentagem de recuperação global não é significativamente diferente de 100%, pelo que não são evidenciados erros sistemáticos.

Quanto à incerteza padrão relativa, esta dá-nos uma medida da exatidão. Deste modo, quanto menor a incerteza, maior será a exatidão.

Foi assumido o valor de 8,00% de incerteza de exatidão dado corresponder ao máximo dos níveis 200 e 400 ng/mL.

1.8. Recuperação

A recuperação foi avaliada de acordo com a metodologia descrita no ponto 6.8 do capítulo de Materiais e Métodos a dois níveis de concentração: 200 ng/ml e 400ng/ml

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 26:

Tabela 26: Resultados da recuperação média

Concentração	Valor de recuperação (%)
200 ng/ml	101
400 ng/ml	104

Os resultados obtidos encontram-se dentro dos valores estabelecidos pelo LAFTM (entre 40% e 120%), uma vez que as percentagens de recuperação se encontram entre os 101% e os 104%.

1.9. Robustez

Durante o procedimento de validação do método desenvolvido foram introduzidas pequenas variações no decurso do habitual funcionamento do laboratório com o objetivo de estudar o parâmetro da robustez. Durante esse período de tempo não se verificaram alterações significativas que afetassem os parâmetros em estudo.

2. Validação do método de rastreio

Um dos objetivos dos estudos de prevalência é estudar a repercussão de um atributo sobre uma população, pelo que se torna necessário utilizar uma metodologia que permita obter resultados que traduzam a realidade da população em estudo. Para avaliar a prevalência do consumo de cotinina em amostras de urina a técnica analítica que apresenta especificidade e sensibilidade adequada para a sua análise é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). No entanto, devido à sua complexidade e ao número elevado de amostras a analisar, é útil o recurso a técnicas imunoenzimáticas, vulgarmente designadas por testes rápidos, que são simples e rápidas de executar. Neste trabalho foi utilizada também uma técnica imunoenzimática na análise de rastreio com o objetivo de calcular a sensibilidade e o valor preditivo negativo do teste visando a sua aplicação como método de rastreio no âmbito das atividades do Laboratório de Análises Fármaco-Toxicológicas da Marinha. Para o efeito foram submetidas a análise de rastreio: amostras negativas, amostras positivas (fortificadas) e 158 amostras reais provenientes de candidatos civis à Escola Naval.

Todas as amostras, independentemente do seu resultado positivo ou negativo no teste de rastreio, foram posteriormente submetidas a análise de confirmação por GC-MS, tendo-se confirmado os resultados obtidos nos testes de rastreio.

Nas tabelas 27 e 28 estão descritos todos os resultados obtidos

Tabela 27: Resultados da análise de rastreio e confirmação por GC-MS

Amostras	Resultados	
	Rastreio	Confirmação
Negativas	195	191
Positivas	63	67
Total	258	

Os valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram calculados a partir das seguintes fórmulas:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo (\%)} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FP})$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo (\%)} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FN})$$

Legenda:

VP: Verdadeiro Positivo – Resultado **positivo** na análise de rastreio e **positivo** na confirmação por GC-MS.

VN: Verdadeiro Negativo – Resultado **negativo** na análise de rastreio e **negativo** na confirmação por GC-MS.

FP: Falso Positivo – Resultado **positivo** na análise de rastreio e **negativo** na confirmação por GC-MS.

FN: Falso Negativo – Resultado **negativo** na análise de rastreio e **positivo** na confirmação por GC-MS.

VPP: Probabilidade de um resultado **positivo** na análise de rastreio ser confirmado como **positivo** por GC-MS.

VPN: Probabilidade de um resultado **negativo** na análise de rastreio ser confirmado como **negativo** por GC-MS.

Tabela 28: Resultados da sensibilidade e especificidade dos testes de rastreio

Verdadeiro Positivo (VP)	63
Verdadeiro Negativo (VN)	191
Falso Positivo (FP)	0
Falso negativo (FN)	4
Sensibilidade	94%
Especificidade	100%
Valor Preditivo Positivo (VPP)	100%
Valor Preditivo Negativo (VPN)	98%

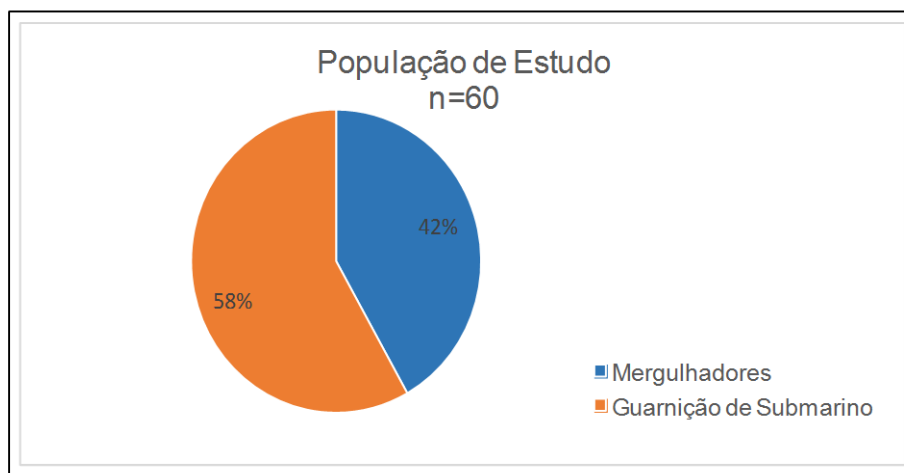
O valor de 94% obtido para a sensibilidade (percentagem do total de positivos que são verdadeiros positivos) e o valor preditivo negativo de 98% (probabilidade de um resultado negativo resultante de um teste de rastreio ser um verdadeiro negativo), revelam-se adequados à realização deste estudo, uma vez que se trata de uma avaliação qualitativa e não quantitativa, como tal é possível avaliar a presença de cotinina em amostras de urina.

3. Prevalência do consumo de nicotina na população de estudo

3.1. Questionários

Atualmente constituem o efetivo da Esquadrilha de Submarinos, entre Mergulhadores e Guarnição de Submarino, cerca de 160 militares, no entanto para a realização deste trabalho contámos com a colaboração, voluntária, de apenas 60 militares, uma vez que só nos foi possível recolher amostras durante um dia, e alguns militares se encontravam a exercer as suas funções fora da sua Unidade de colocação ou estavam ausentes, por outras razões. Conforme representado no gráfico 3, a população de estudo conta com uma maior colaboração de militares da Guarnição de Submarino.

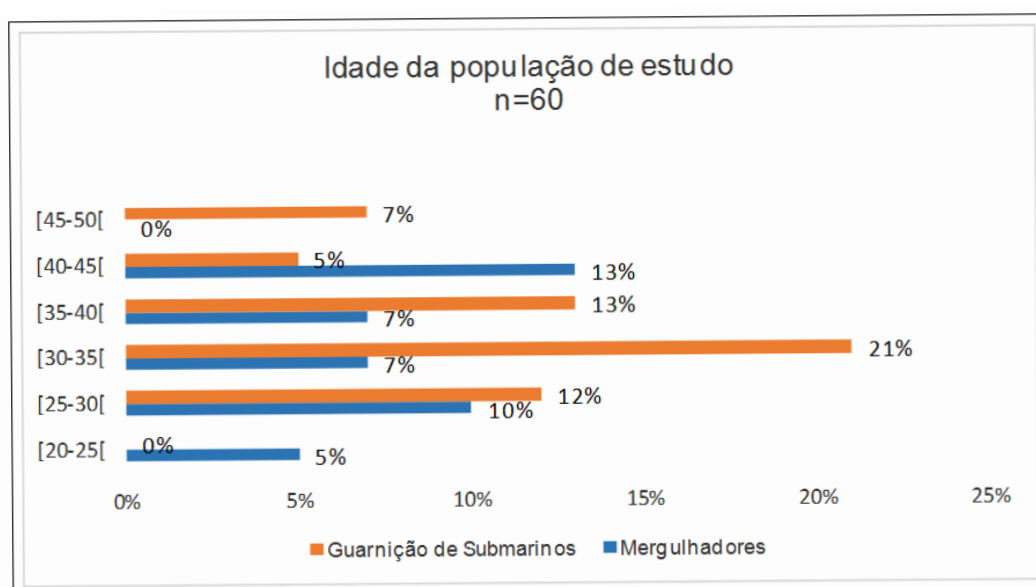
Gráfico 3: Distribuição dos militares por especialidade



O facto de se tratar de uma população constituída exclusivamente por militares do sexo masculino, prende-se com as características das funções a exercer, muitas vezes bastante exigentes do ponto de vista físico e psicológico, razão pela qual algumas especialidades não aceitam, historicamente, militares do

sexo feminino. A distribuição da população por faixa etária é bastante heterogênea sendo que a distribuição na Guarnição de Submarino se concentra entre os 30 e os 35 anos, conforme representado no gráfico 4.

Gráfico 4: Distribuição da população por faixa etária

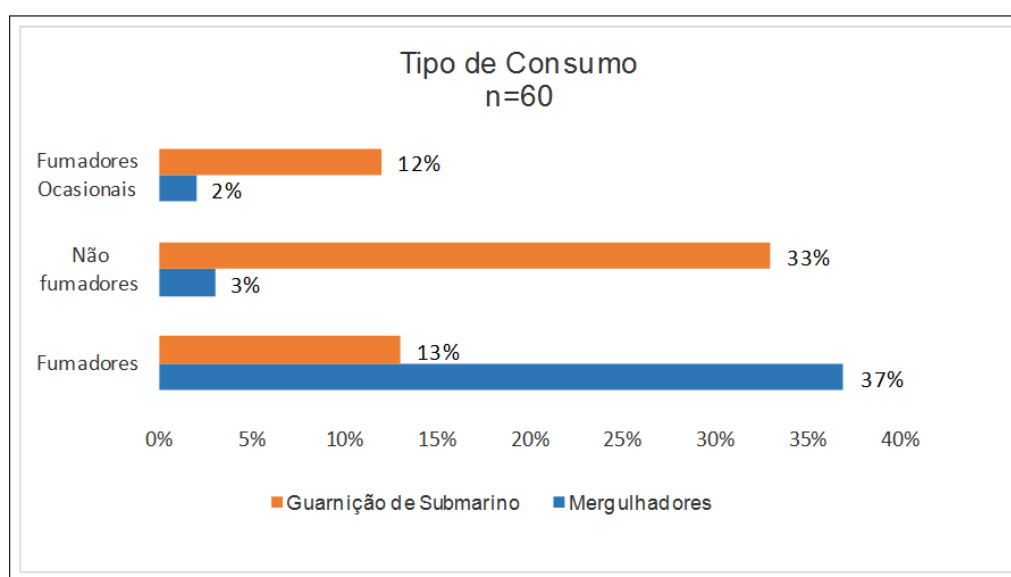


Durante a colheita das amostras, solicitou-se a cada militar o preenchimento de um questionário (anexo II), anônimo, onde indicou o tipo de consumo, a idade de início do consumo, a média de cigarros que fuma por dia, há quanto tempo teria fumado o último cigarro, e outras informações relativas a cessação tabágica.

Com base na informação fornecida pelos militares, verificou-se que 37% dos Mergulhadores que participaram neste estudo eram fumadores, um valor quase três vezes superior à percentagem de fumadores entre a Guarnição de Submarino (13%). Alguns dos militares declararam ser apenas fumadores ocasionais, no entanto, de acordo com a informação por eles fornecida, alguns

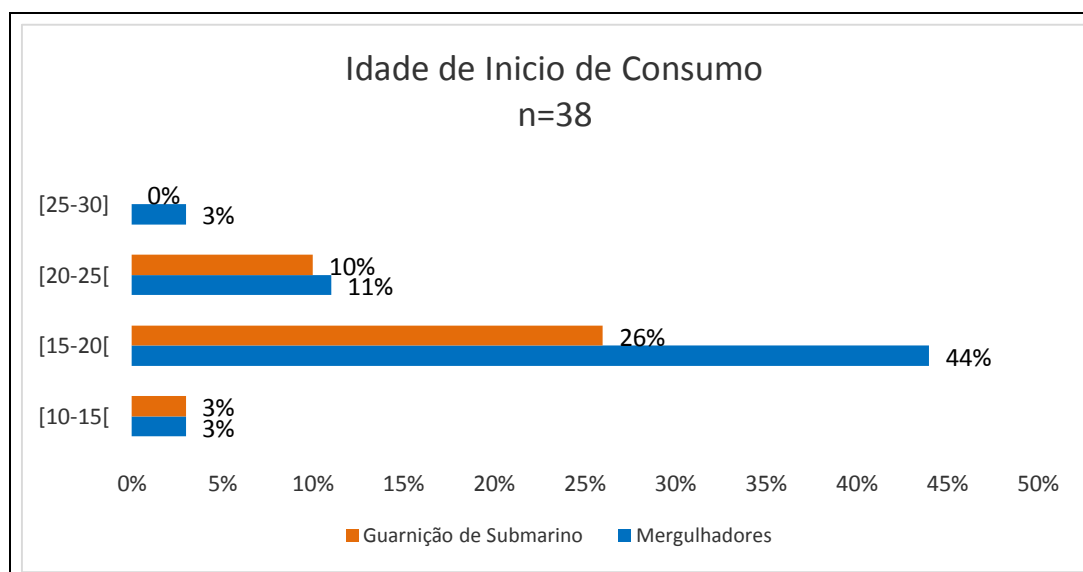
tenham fumado pouco tempo antes do início das colheitas, que decorreu pelas 10 horas. No gráfico 5 estão representados os valores relativos ao tipo de consumo, de acordo com a informação recolhida nos questionários.

Gráfico 5: Tipo de consumo



À semelhança do que se verifica na população civil, segundo o estudo “Eurobarómetro” (45), em que a média de início do consumo de tabaco ronda os 17,7 anos, o início de consumo pelos militares inquiridos ocorre, essencialmente, entre os 15 e os 20 anos, como representado no gráfico 6.

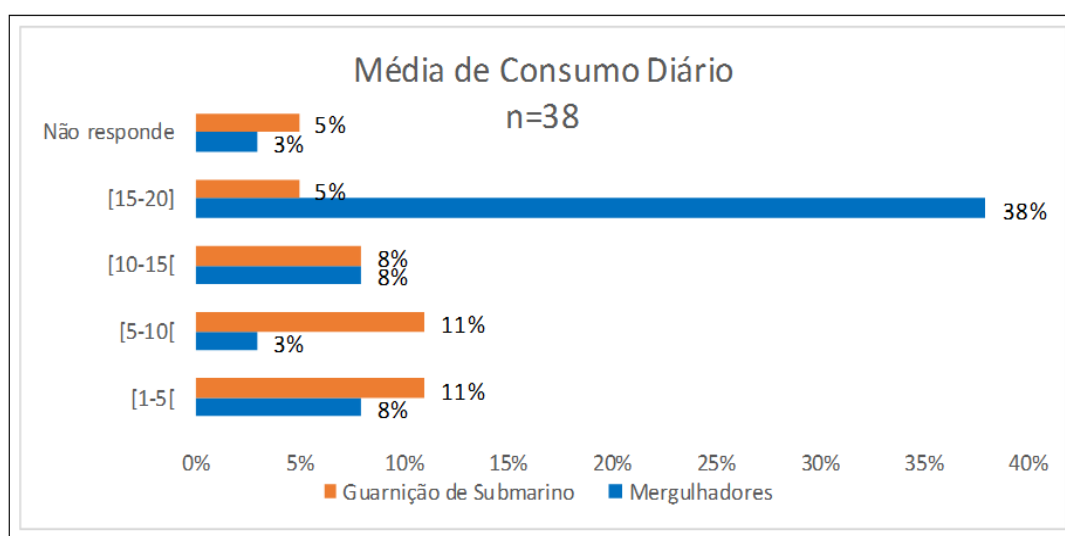
Gráfico 6: Idade de início de consumo por parte da população de estudo



O consumo de tabaco por indivíduos que fumem mais de 15 cigarros por dia reduz em 5 anos a esperança média de vida do consumidor (32). Na população de estudo, e ainda de acordo com informações recolhidas nos questionários, o consumo de tabaco é muito elevado, principalmente entre Mergulhadores. De acordo com o gráfico 7, 38% dos Mergulhadores fuma entre 15 a 20 cigarros por dia, o que do ponto de vista fisiológico, pode comprometer, a médio ou longo prazo, a execução das suas funções. Por outro lado, o consumo por parte dos militares que constituem a Guarnição de Submarino é inferior a 15 cigarros por dia. Quando questionados sobre a possibilidade ou tentativa de cessação do consumo, apenas três dos indivíduos declararam ter tomado a iniciativa para combater o vício (verificar tabelas do anexo III). Um dos indivíduos, tal como a maioria dos fumadores, recorre a pastilhas de nicotina. Os outros dois indivíduos recorrem a pensos de nicotina, no entanto um destes

estava, à data, a ser acompanhado na UTITA, e recorre ao uso de ansiolíticos, devidamente prescritos. Importa referir que os indivíduos que tentam cessar o consumo de tabaco são Mergulhadores, o que sugere a existência de alguma consciência dos efeitos negativos do consumo.

Gráfico 7: Média de consumo diário por parte da população de estudo



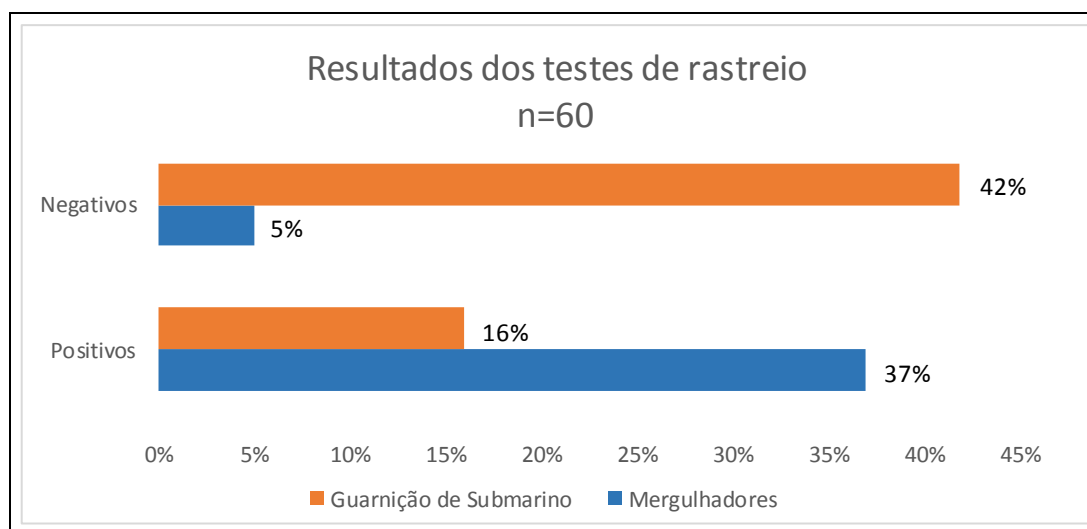
3.2. Amostras de urina

Todas as amostras da população de estudo foram submetidas a análise de rastreio e, posteriormente, a análise de confirmação.

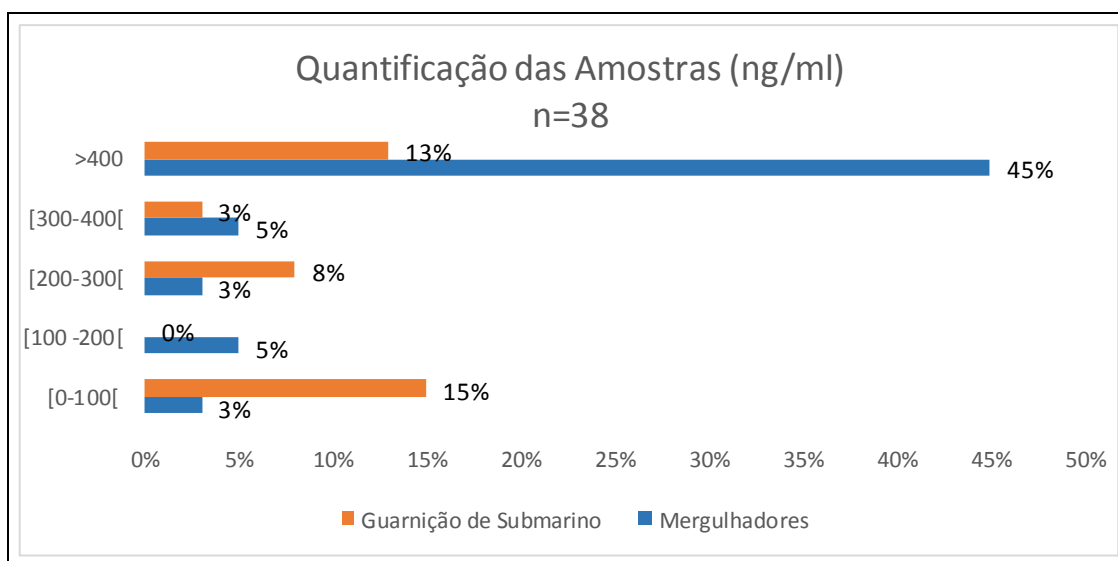
Um dos objetivos deste estudo prendeu-se com a validação do método de rastreio utilizado e uma estimativa de concentração de cotinina na urina. A partir destes resultados, e utilizando os dados obtidos através dos questionários, pretendeu-se fazer a associação entre o número de cigarros fumados por dia e o valor de cotinina quantificado na urina.

No gráfico 8 estão representados os resultados obtidos nos testes de rastreio.

Gráfico 8: Resultados dos testes de rastreio



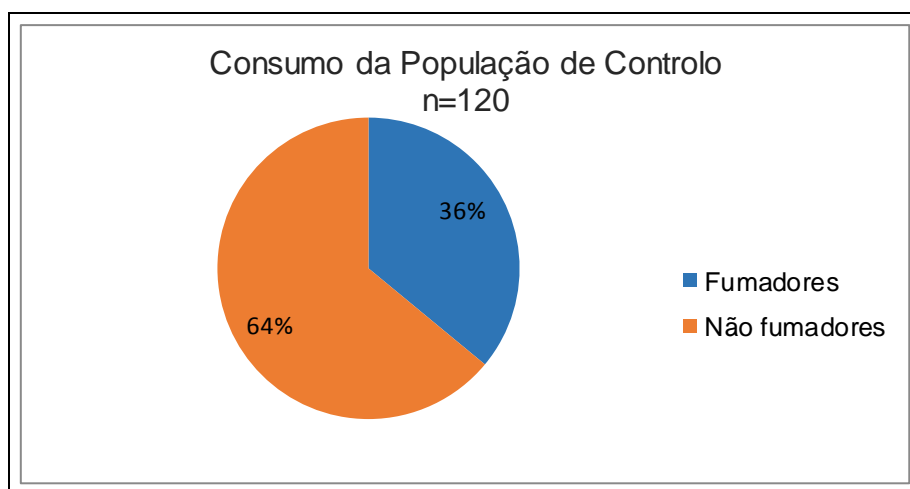
Os valores obtidos nos testes de rastreio mostraram um consumo elevado por parte dos Mergulhadores (37%), tal como havia sido declarado pelos mesmos (38%). Dos 25 Mergulhadores que participaram no estudo, 80% apresentaram resultado positivo no rastreio. Todas as amostras positivas no teste de rastreio confirmaram-se positivas no teste de confirmação com valores superiores a 200 ng/ml. Relativamente aos militares da população de Guarnição de Submarinos que declararam ser fumadores passivos/ocasionais (4), as amostras confirmaram-se positivas para cotinina, no entanto com valor inferior ao valor de *cut-off* (200 ng/ml). Nesta população 11% das amostras positivas no rastreio apresentaram valores de cotinina entre 200 e 400 ng/ml, e as restantes 14% das amostras positivas no rastreio valores de cotinina acima dos 400 ng/ml, o que corresponde a fumadores com consumo elevado, acima de 20 cigarros por dia (gráfico 9). No caso da população de Mergulhadores o consumo superior a 20 cigarros por dia (concentração de cotinina > 400 ng/ml) é significativamente mais elevado (45%).

Gráfico 9: Resultado da quantificação das amostras

Até à data não são conhecidos estudos epidemiológicos nas Forças Armadas relativos ao consumo de tabaco, como tal, para além da população problema, foi utilizada uma população composta por militares selecionados de forma aleatória para rastreio toxicológico, no âmbito das medidas de prevenção do consumo, inseridas no “Programa para a Prevenção e Combate à Droga e Alcoolismo nas Forças Armadas”, com o objetivo de conhecer a realidade do consumo na Marinha Portuguesa.

Para o efeito foram selecionadas 120 militares a quem foi solicitado o preenchimento de um questionário e recolha de urina.

Perante os resultados obtidos verificou-se que dos 120 militares analisados, 36% referiram ser fumadores (gráfico 10), sendo que nenhum militar referiu ser fumador ocasional, verificando-se que cerca de metade (44%) dos mesmos apresentam um valor de cotinina na urina acima dos 400 ng/ml.

Gráfico 10: Resultados do consumo para a população de controlo

Os valores relativos ao consumo na população de controlo (36%), não diferem dos valores do consumo por parte dos Mergulhadores (37%). Apesar desta semelhança, os valores obtidos são relevantes na medida em que o consumo por parte dos Mergulhadores, pela especificidade das funções exercidas pelos mesmo, seria de esperar que fossem inferiores aos valores do consumo por parte dos militares da Guarnição de Submarino e da população controlo.

No entanto os dados não são suficientes para estabelecer uma relação entre o consumo nesta população e o consumo a nível global na Instituição.

CAPITULO V – Conclusão

Não sendo conhecidos estudos epidemiológicos que permitam conhecer a realidade do consumo de tabaco pelos elementos das Forças Armadas em geral, nem da Marinha Portuguesa em particular, pretendeu-se com a presente dissertação validar metodologia analítica de rastreio e de confirmação que permita no futuro uma monitorização do problema através do rastreio de consumo de tabaco mediante a deteção na urina da presença de cotinina, principal metabolito da nicotina.

Na presente dissertação são apresentados os resultados de um estudo de prevalência do consumo de nicotina por militares pertencentes à Esquadilha de Submarinos, Mergulhadores e Guarnição de Submarino. Pelo facto da informação relativa ao consumo de qualquer substância psicoativa, em qualquer Instituição Militar constituir matéria “classificada”, torna difícil a comparação dos resultados obtidos quer com outros ramos das Forças Armadas, quer com a de outros países.

O estudo realizado teve por objetivos, por um lado, a validação de um ensaio imunoenzimático utilizado na análise de rastreio de cotinina e por outro determinar a prevalência do consumo de nicotina por militares.

No que diz respeito à validação do método e à sua aplicabilidade no âmbito das atividades do LAFTM, os resultados obtidos permitiram estabelecer as seguintes conclusões:

Relativamente à validação dos testes de rastreio, os valores obtidos para a sensibilidade (94%), assim como o valor preditivo negativo elevado (98%), permitem a utilização destes testes no rastreio de consumo de tabaco através

da análise de urina, com um elevado grau de confiança. De futuro, estes testes poderão estar presentes em várias Unidade da Marinha, como, por exemplo, na Esquadilha de Submarinos ou na UTITA, permitindo o maior controlo do consumo, e dessa forma inserir militares em programas de cessação tabágica. No que diz respeito à validação do método de deteção e quantificação de cotinina, a metodologia de extração líquido-líquido utilizada permitiu a obtenção de cromatogramas limpos, com reduzido número de interferentes e com valores de recuperação entre os 101 e 104%. O método mostrou-se seletivo, não se observaram fenómenos de arrastamento mostrando limites de deteção e quantificação adequados ao objetivo da sua utilização futura.

Os resultados obtidos para a precisão intermédia e para o parâmetro da exatidão assim como os restantes parâmetros de validação preenchem os requisitos estabelecidos pelo LAFTM, como tal é possível considerar o método validado e apto para a determinação e quantificação de cotinina em amostras de urina.

O estudo da prevalência do consumo entre militares permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

Neste estudo verificou-se que o consumo entre Mergulhadores (37%) quase três vezes superior ao consumo por parte de militares que constituem a Guarnição de Submarinos (16%), sendo que nesta última se verificou a existência de fumadores ocasionais, relativamente aos quais será necessário um teste de rastreio com um valor de *cut-off* inferior.

Os fumadores habituais referiram que durante um dia o consumo podia chegar aos 20 cigarros por dia. Perante os valores obtidos nos questionários e os obtidos na análise das amostras foi possível estabelecer a seguinte relação:

Fumadores com consumo superior a 20 cigarros por dia apresentavam valores de cotinina na urina superiores a 400 ng/ml;

Nos militares com consumo entre 10 e 20 cigarros por dia e que fumaram o ultimo cigarro 1 hora antes das colheitas, os valores de cotinina variavam entre os 200 e os 300ng/ml;

Nos militares com consumo inferior a 10 cigarros por dia e que fumaram o último cigarro mais de uma hora antes da colheita, apresentaram valores de cotinina inferiores a 200ng/ml (neste grupo estarão incluídos os fumadores ocasionais).

Perante os valores obtidos seria importante que a Instituição desenvolvesse programas específicos direccionados, numa fase inicial, para Mergulhadores, uma vez que as alterações fisiológicas que sofrem durante o exercício das suas funções pode ser consideravelmente influenciado pelo consumo de tabaco.

1. Perspetivas futuras

Os testes de rastreio utilizados na validação do método de rastreio permitem identificar, com elevado grau de confiança, amostras de fumadores. com valores de cotinina na urina superiores a 200 ng/ml. No entanto as amostras de fumadores passivos ou ocasionais podem passar despercebidas, uma vez que os valores de cotinina na urina são inferiores ao valor de *cut-off* estabelecido pelo fornecedor destes testes. Seria conveniente que os testes a usar de futuro

apresentassem um valor de *cut-off* inferior a 200ng/ml, uma vez que os militares inseridos em programas de cessação tabágica, e de acordo com o esperado, devem passar de uma situação de fumador ativo, para fumador ocasional.

Relativamente ao estudo da prevalência do consumo de nicotina, os dados não são suficientes para estabelecer uma relação entre o consumo nesta população e o consumo a nível global na Instituição. Para que tal fosse possível seria necessário alargar a população de estudo, selecionando um determinado número de indivíduos de cada Unidade, em função do número total de militares que a constitui e só depois determinar a prevalência do consumo de nicotina entre militares da Marinha Portuguesa.

Independentemente da relação que possa ser estabelecida, os valores já apontam para um consumo bastante elevado na população problema, por essa razão faria todo o sentido que estes militares fossem inseridos em programas de cessação tabágica.

Também poderiam ser realizadas, com maior frequência, ações de sensibilização com o objetivo de incentivar a cessação do consumo de tabaco.

Referências Bibliográficas

1. WHO. WHO report on the global tobacco epidemic, 2008.
MPOWER Packag [Internet]. 2008; Available from:
http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596282_jpn.pdf
2. European Commission. Survey on Tobacco. Analytical report.
Heal (San Fr [Internet]. 2009;(December 2008):1–98. Available
from: http://ec.europa.eu/public_opinion/flash/fl_253_en.pdf
3. DGS. Portugal Prevenção e Controlo do Tabagismo em
Números - 2013. 2013;
4. Feijão F. Inquérito Nacional em Meio Escolar, 2011, SICAD.
2011;
5. DGS. PORTUGAL Prevenção e Controlo do Tabagismo em
números - 2014. 2014;84.
6. Rosemberg J. Nicotina, Droga Universal. 2003.
7. MOUTINHO AV. Publicidade, tabaco e estratégias. actas das
III Jornadas Publicidade e Comun [Internet]. 2008; Available
from:
<https://drive.google.com/file/d/0B0HvJttn0WXdZ1RnZ1RBYWxZWw/view?usp=sharing>
8. Silva ABM. A “cencura do tabaco” do P.e Jerónimo da Mota e

- dois escritos de Ribeiro Sanches. Braga; 1985. 80 p.
9. D'Almeida CEM. O Tabaco - Vicio Brando e Util. Rotary Club Lisboa. 1931;
 10. Matteo V Di, Pierucci M, Esposito E. Selective stimulation of serotonin 2C receptors blocks the enhancement of striatal and accumbal dopamine release induced by nicotine administration. 2004;418–29.
 11. Cattaneo R, Paula A, Rodrigues F, Mariante C, Abreu D. Validação de método para determinação de cotinina em urina por cromatografia líquida de alta eficiência. 2006;6.
 12. Martin JW, Mousa SS, Shaker O, Mousa SA. The multiple faces of nicotine and its implications in tissue and wound repair. 2009;497–505.
 13. Malafatti L, Martins I. Aspectos analíticos da determinação de continina em matrizes biológicas. 2009;(6).
 14. Seeley RR, Stephens TD. Anatomia e Fisiologia. 1ª Edição. Lusodidacta; 1997.
 15. Tolentino M, Luiz F, Araújo O De, Helvira F, Félix C, Felipe A, et al. Álcool e nicotina : mecanismos de dependência. 2010;18(4):531–7.
 16. Yu G, Chen H, Wu X, Matta SG, Sharp BM. Nicotine self-

- administration differentially modulates glutamate and GABA transmission in hypothalamic paraventricular nucleus to enhance the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *J Neurochem.* 2010;113(4):919–29.
17. Franken RA, Nitrini G, Franken M, Fonseca AJ, Leite JCT, Paulo S. Nicotina . Ações e Interações. 1996;371–3.
 18. Frishman WH. Smoking Cessation Pharmacotherapy — Nicotine and Non-Nicotine Preparations. 2007;10–22.
 19. Hukkanen J, Iii PJ, Benowitz NL. Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. 2005;57(1):79–115.
 20. DGS. Programa Nacional para a Prevenção e Controlo do Tabagismo. 2012;1–13.
 21. DRE. Lei n.º 22/82 de 17 de Agosto. 1978;5–6.
 22. DRE. Lei n.º 37/2007 de 14 de Agosto. Diário da República, 1ª série — N.º 156 — 14 Agosto 2007. 2007;5277–85.
 23. Campos A, Carvalho P. Em nove anos, apesar da lei do tabaco, consumo baixou apenas 1% em Portugal [Internet]. *Jornal Publico.* 2016 [cited 2016 Mar 2]. Available from: <https://www.publico.pt/sociedade/noticia/em-nove-anos-consumo-de-tabaco-baixou-menos-de-1-em-portugal-1724946>
 24. Carrilho JM. Programas de Assistência a Empregados: Álcool

- e outras drogas em meio laboral. An do Clube Mil Nav. 2002;325–56.
25. Freitas LC. Manual de Segurança e de Saúde do Trabalho. 2^a edição. Edições Silabo, Lda; 2011. 669-702 p.
 26. Ministério da D. Programa para a Prevenção e Combate à Droga e ao Alcoolismo nas Forças Armadas. In 2010.
 27. Organizacao da Marinha Portuguesa [Internet]. [cited 2016 Mar 16]. Available from: <http://www.marinha.pt/pt-pt/marinha/organizacao/Paginas/Organizacao.aspx>
 28. Spira A. Diving and Marine Medicine Review. 1999;180–98.
 29. Martz C. Cardiovascular Conditioning and diver safety. 2004.
 30. Scuba Schools International. Science of Diving. 2010 ISBN-13: 978-1-60579-075-b
 31. U.S. Navy. U.S. Navy Diving Manual Revisison 6. Nav Sea Syst Command [Internet]. 2008;1(SUPERSEDES SS521-AG-PRO-010, REVISION 5, Dated 15 August 2005.):992. Available from: http://www.usu.edu/scuba/navy_manual6.pdf
 32. Ranz A. The Impacts of Smoking on Diving. 2004.
 33. Caruso BJ. Caution First Why Cigarette Smoking and Diving Don ' t Mix. 2004;29–33.
 34. Quintas A, Freire AP, Halpern MJ. Bioquímica - Organização

- Molecular da Vida. Lidel; 2008. ISBN:978-972-757-431-5
35. Castro M, Clero CR, Silva NT da. Segurança e saúde no trabalho e a Prevenção do consumo de substâncias psicoativas: Linhas orientadoras para intervenção em meio laboral. 2011. 1-88 p.
 36. Moylan S, Jacka FN, Pasco JA, Berk M. How cigarette smoking may increase the risk of anxiety symptoms and anxiety disorders : a critical review of biological pathways. 2013;
 37. Bhutani S. Implications of a smoking ban on submarines in the US Navy. Med J Armed Forces India. 2012;68(2):199.
 38. Henningfield JE, Fant R V, Buchhalter AR, Stitzer ML. Pharmacotherapy for Nicotine. 2005;55(5):281–99.
 39. Stead L, Perera R, Bullen C, Mant D, Cahill K, Lancaster T. Nicotine replacement therapy for smoking cessation (Review). 2012;(11).
 40. McRobbie H, Bullen C, Hajek P. Electronic cigarettes for smoking cessation and reduction (Review). 2014;(12).
 41. Hajšlová J, Cajka T. Gas chromatography – mass spectrometry (GC- MS). In: Food Toxicants Analysis. 2007. p. 419–73.
 42. Langford A, Dean J, Reed R, Holmes D, Weyers J, Jones A.

- Practical Skills in Forensic Science. 1st Editio. Pearson
Prentice Hall; 2005. ISBN-13: 978-0-13-114400-2
43. IPAC. GUIA PARA A APLICAÇÃO DA NP EN ISO / IEC
17025. 2010.
44. Relacre. Guia Relacre 13, Validação de métodos internos de
ensaio em análise química. Assoc Laboratórios Acreditados
Port. 2000;1–30.
45. European Commission. ATTITUDES OF EUROPEANS
TOWARDS TOBACCO Conducted by TNS Opinion & Social at
the request of. 2012;(March).

ANEXOS

Anexos

Anexo I - Condições cromatográficas e do detetor de massa.

Instrument Method: nicotina_versSCAN01

AI/AS 3000 Method

Sampling
Sample Volume: 2.00 ul
Plunger strokes: 1
Viscous sample: No
Sampling depth in vial: Bottom

Injection
Injection depth: Standard
Pre-Inj dwell time: 0 s
Post-Inj dwell time: 0 s

Washes
Pre-Inj. solvent: A
Pre Inj. solvent cycles: 6
Sample rinses: 1
Post-Inj. solvent: B
Post-Inj. solvent cycles: 6

MS Method

Acquisition Time: GC Run Time
Cal Gas: Off
Reagent Gas: Off
Acquire Profile: No
Acq Threshold: 0
Source Temp: 250 C

Segment 1
Start Time: 2.00 minutes
Detector gain: 195000
ChromFilterWidth: Off
Reagent Gas Flow: Off

Scan Event 1
Scan Rate: 500.00
Mass Defect: 0.00
Polarity: POS
Use Tune File Emission Current
Scan Mode: Full Scan
First Mass: 50.0
Last Mass: 650.0

Segment 2
Start Time: 3.00 minutes
Detector gain: 195000
ChromFilterWidth: Off
Reagent Gas Flow: Off

Scan Event 1
Mass Defect: 0.00
Polarity: POS
Use Tune File Emission Current
Scan Mode: SIM
Mass: 98.00 Width: 1.00 Dwell Time: 100.0
Mass: 101.00 Width: 1.00 Dwell Time: 100.0
Mass: 176.00 Width: 1.00 Dwell Time: 100.0

TRACE GC Ultra Method

Oven Method

Initial Temperature (C):	60
Initial Time (min):	0.00
Number of Ramps:	1
Rate #1 (deg/min):	50.0
Final Temperature #1 (C):	210
Hold Time #1 (min):	2.00
Post Run Temperature:	Off
Enable Cryogenics:	Off
Maximum Temperature (C):	350
Prep Run Timeout (min):	10.00
Equilibration Time (min):	0.05

Right SSL Method

Base Temperature:	On
Base Temperature (C):	220
Mode:	Split
Split Flow:	On
Split Flow Flow (ml/min):	10
Splitless Time (min):	1.00
Surge Pressure:	Off
Surge Pressure (kPa):	3.00
Surge Duration (min):	0.00
Constant Purge:	On
Stop Purge At: (min):	0.00

Right Carrier Method

Mode:	Constant Flow
Initial Value:	On
Initial Value (ml/min):	1.00
Initial Time:	1.00
Gas Saver:	Off
Gas Saver Flow (ml/min):	20
Gas Saver Time:	2.00
Vacuum Compensation:	Off

Left SSL Method

Base Temperature:	Off
Base Temperature (C):	230
Mode:	Split
Split Flow:	Off
Split Flow Flow (ml/min):	10
Splitless Time (min):	1.00
Surge Pressure:	Off
Surge Pressure (kPa):	3.00
Surge Duration (min):	0.00
Constant Purge:	On
Stop Purge At: (min):	0.00

Left Carrier Method

TRACE GC Ultra Method

External Event #4 Prep-Run Default:	Off
External Event #5 Prep-Run Default:	Off
External Event #6 Prep-Run Default:	Off
External Event #7 Prep-Run Default:	Off
External Event #8 Prep-Run Default:	Off

TRACE GC Ultra Method

Mode:	Constant Pressure
Initial Value:	On
Initial Value (kPa):	3.00
Initial Time:	1.00
Gas Saver:	Off
Gas Saver Flow (ml/min):	20
Gas Saver Time:	2.00
Vacuum Compensation:	Off

No Right Detector

Left NPD Method

Base Temperature:	Off
Base Temperature (C):	300
Source Current:	Off
Source Current (A):	2.740
Target Current (A):	0.0
Auto Adjust:	Off
Polarization Vltg (V):	3.5
H2:	Off
H2 Flow (ml/min):	2.30
H2 Delay:	Off
H2 Delay (min):	0.00
Air:	Off
Air Flow (ml/min):	60
Makeup Gas:	On
Makeup Gas Flow (ml/min):	15

Left Signal Method

Offset:	Off
Offset Value:	0
Autozero:	Off
Range:	1
Gain:	1
Negative Polarity:	Off
Analog Filter:	Off

No Aux Detector

Aux Zones

Aux 1 MS Transfer Line:	On
Aux 1 MS Transfer Line (C):	280
Aux 2 :	Off
Aux 2 (C):	30

Run Table

External Event #1 Prep-Run Default:	Off
External Event #2 Prep-Run Default:	Off
External Event #3 Prep-Run Default:	Off

Anexo II - Questionário

**"Toxicologia Laboratorial na Análise do Consumo de Nicotina por Militares"**

O presente questionário destina-se à realização de um projecto de Dissertação de Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses no qual se pretende traçar a prevalência do consumo de nicotina por militares. Trata-se de um questionário anónimo, pelo que agradecemos a sua colaboração sincera.

Número de código: _____ (a preencher pelo LAFTM)

Unidade: _____ Especialidade/ Classe: _____

Sexo: Masculino ☐ Feminino ☐

Idade: _____

1. É fumador?

Sim ☐ (passe à questão 2) Não ☐ (passe à questão 6)
Ocasional ☐ (passe à questão 2)

2. Idade de início de consumo: _____

3. Quando fumou o último cigarro? _____

4. Quantos cigarros fuma, em média, por dia? _____

5. Está a tentar, ou já tentou, deixar de fumar?

Sim ☐ (passe à questão 5.1) Não ☐ (passe à questão 6)

5.1. Com acompanhamento médico?

Sim ☐ (passe à questão 5.2) Não ☐ (passe à questão 5.2)

5.2. Com recurso a medicação?

Sim ☐ (passe à questão 5.3) Não ☐ (passe à questão 6)

5.3. Qual? _____

6. Frequenta ambientes com fumadores?

Sim ☐ Não ☐

Data: _____

Obrigado pela sua colaboração!

Anexo III - Relação dos dados relativos às amostras reais

Tabela 29 : Dados da População de Guarnição de Submarino

Amostra	Género	Idade	Idade de início	Ultimo cigarro	Média diária	Quest.	Teste Rastreio	Confirmação GC-MS
1	M	39	22	12h	10 a 12	S	P	>400 ng/ml
2	M	44	20	30 dias	2	O	N	0
4	M	45				N	N	0
5	M	35	19	1h	1	O	P	282,2 ng/ml
6	M	34				N	N	0
10	M	30	18	1h	10	S	P	>400 ng/ml
11	M	32				N	N	0
12	M	31				N	N	0
13	M	26	18	1h	5	S	P	92,3 ng/ml
14	M	30				N	N	0
15	M	27				N	N	0
16	M	31				N	N	0
17	M	35				N	N	0
18	M	25				N	N	0
19	M	39				N	N	0
20	M	39				N	N	0
21	M	26				N	N	0
22	M	49	18	7dias		O	N	0
26	M	38				N	N	0
30	M	41	22	1h	6	O	P	202,9 ng/ml
33	M	47	16	1h	20	S	P	>400 ng/ml
34	M	49				N	N	0
35	M	33	12	1h	2	O	N	<82 ng/ml
36	M	31				N	N	<82 ng/ml
37	M	30	17	1h	8	S	P	331,8 ng/ml
38	M	30				N	N	0
41	M	29	18	7 dias	1	O	N	0
42	M	40	20	40min	10 a 17	S	P	>400 ng/ml
49	M	32				N	N	0
51	M	35	16	2 meses		O	N	<82 ng/ml
52	M	36	16	2min	20	S	P	>400 ng/ml
53	M	32				N	N	0
54	M	33				N	N	0
55	M	29	15	45min	8 a 10	S	P	275,2 ng/ml
56	M	27				N	N	0

Tabela 30: Dados da População de Mergulhadores

Amostra	Género	Idade	Idade de início	Ultimo cigarro	Média diária	Quest.	Teste Rastreio	Confirmação GC-MS
3	M	39	20	1h30	12	S	P	355,7 ng/ml
7	M	29	21	1h	20	S	P	>400 ng/ml
8 (a)	M	40	18	5min	15	S	P	>400 ng/ml
9	M	30	16	30min	20	S	P	>400 ng/ml
23	M	28	18	5min	20	S	P	>400 ng/ml
24	M	25	16	30min	20	S	P	>400 ng/ml
25 (b)	M	45	11	35min	20	S	P	>400 ng/ml
27	M	22	18	30min	20	S	P	>400 ng/ml
28	M	22	19	1h	3 a 4	S	P	353,6 ng/ml
29	M	39	20	1h30	12	S	P	>400 ng/ml
31	M	44	16	1h	20	S	P	>400 ng/ml
32 (c)	M	40	18	10min	20	S	P	>400 ng/ml
39	M	31	15	10min	10	S	P	>400 ng/ml
40	M	38				N	N	0
43	M	31	17	12h	2	O	P	183,1 ng/ml
44	M	40	17	1h	20	S	P	>400 ng/ml
45	M	38	16	30min	20	S	P	>400 ng/ml
46	M	28	22	20min	6	S	P	286 ng/ml
47	M	27	17	30min	15	S	P	>400 ng/ml
48	M	27	17	20h	Indeterminado	S	P	104,2 ng/ml
50	M	45	16	30min	20	S	P	>400 ng/ml
57	M	22	17	30min	20	S	P	>400 ng/ml
58	M	42				N	N	0
59	M	43	29	30min	20	S	P	>400 ng/ml
60	M	32	19	15h	2	S	N	<82 ng/ml

Legenda:

“S”: Sim ; “N”: Não; “O”: Ocasional

a) Militar recorre a pensos de nicotina

b) Militar recorre a pensos de nicotina e ansiolíticos prescritos no âmbito do PPCDAFA, na UTITA.

c) Militar recorre a pastilhas de nicotina